

Aus dem Zentrum der Kinderheilkunde
des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe – Universität
Frankfurt am Main
Klinik für Kinderheilkunde III
(Pädiatrische Hämatologie und Onkologie)
Direktor: Professor Dr. med. Klingebiel

Monitoring der Mobilisierung
CD34+ hämatopoetischer Stammzellen
mit G-CSF
bei pädiatrisch-onkologischen Patienten
vor autologer Stammzelltransplantation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Vorgelegt von
Konrad Bochennek
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2004

Dekan: Herr Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referent: Herr Priv.-Doz. Dr. D. Schwabe

Koreferent: Herr Priv.-Doz. Dr. H. Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Dezember 2005

Für meine Eltern

“Felix, qui potuit rerum cognoscere causas.”

Vergil

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Zeitgenössische Modellvorstellungen von der Hämatopoese	2
1.1.1 Strukturelle Analyse der hämatopoetischen Vorgänge	2
1.1.2 Übersicht über die Hämatopoese	3
1.1.3 Der Stammbaum der regelrecht ablaufenden Hämatopoese	4
1.2 Die CD34-Positive Stammzelle	5
1.2.1 Zytologische Betrachtung der CD34+ Stammzelle	5
1.2.2 Das CD34 Oberflächen-Antigen	6
1.2.3 Das CD45 Oberflächen-Antigen	8
1.3 Granulocyte-Colony-Stimulating Factor (G-CSF)	9
1.3.1 Physiologischer und pharmakologischer G-CSF	9
1.3.2 Pharmakodynamik und Wirkung	10
1.3.3 Pharmakokinetik	11
1.3.4 Nebenwirkungen	12
1.4 Klinik und Therapie pädiatrischer Tumorerkrankungen	13
1.4.1 Tumoren in Kindesalter	13
1.4.1.1 Neuroblastom	14
1.4.1.2 Weitere ausgewählte Tumoren des Kindesalters	15
1.4.2 Therapieverfahren	17
1.4.2.1 Hochdosismotherapie und Stammzelltransplantation	17
1.4.2.2 Weitere Therapieverfahren	20
1.5 Die Mobilisierung CD34 positiver bei pädiatrischen Patienten	22
1.5.1 Mobilisierung der CD34+ Zellen im Vorfeld der autologen Stammzelltransplantation	22
1.5.1.1 Therapeutische Einflussnahme auf die Stammzellmobilisierung	22
1.5.1.2 Individualfaktoren	24
1.5.2 Optimierung der Stimulation und Mobilisierung von CD34+ Stammzellen im peripheren Blut	25
1.5.2.1 Den Erfolg der Apherese determinierenden Parameter	25
1.5.2.2 Optimierung der G-CSF-Dosis	26
1.5.2.3 Zeitliche Optimierung der Leukapherese	27
1.5.2.4 Zytogene Beeinflussung	29
1.5.2.5 Large Volume Leukapherese (LVL)	29
1.6 Aufgabenstellung	30

2. Patienten, Material und Methoden	31
2.1 Die Patienten	31
2.2 Material	33
2.2.1 Einwegartikel	33
2.2.2 Geräte und Arbeitsmittel	33
2.2.3 Chemische Reagenzien	34
2.2.4 Antikörper	35
2.2.5 Material für die sterile Blutentnahme am Katheder	35
2.2.6 Blutproben	36
2.2.7 Arzneimittel	37
2.2.8 Computer und Software	38
2.3 Methoden	38
2.3.1 Durchführung des Monitoring	38
2.3.1.1 Stimulation und Mobilisierung der CD34+ Stammzellen in den pädiatrischen Patienten	38
2.3.1.2 Vorbereitung und Nachbereitung	38
2.3.1.3 Organisation und zeitlicher Ablauf des Monitoring	39
2.3.1.4 Die sterile Blutentnahme	41
2.3.2 Labormethodik	44
2.3.2.1 Durchflußzytometrie	44
3.3.2.1.1 Analytische Durchflußzytometrie	44
2.3.2.1.2 Grundlagen der Durchflußzytometrie	44
2.3.2.1.3 Aufbereitung der Proben für die FACS-Analyse	45
2.3.2.1.4 Die Methodik der Durchflußzytometrie	46
2.3.2.2 EDV-gestützte Datenerfassung und Auswertung durchflusszytometrischer Daten	48
2.4 Statistische Auswertung	52
2.4.1 Besonderheiten bei der Datenauswertung	52
2.4.2 Biomathematische Auswertung und Methoden	52
2.4.3 Mathematische Tests	54
2.4.4 Fehlerquellen	54
3. Ergebnisse	56
3.1 Ergebnisse des Monitoring nach einzelnen Messparametern	56
3.1.1 Messung der Leukozytenkonzentration	56
3.1.2 Die CD34+ Zellkonzentration unter dem Einfluß von G-CSF	63
3.1.3 Messung weitere hämatologischer Parameter	68
3.1.3.1 Messung der Erythrozytenkonzentration	68
3.1.3.2 Messung der Hämoglobinkonzentration (Hb), des Hämatokrit, des Mittleren corpusculären Volumens (MCV), des mittleren corpusculären Hämoglobingehaltes (MCH), und der mittleren corpusculären Hämoglobinkonzentration (MCHC)	68
3.1.4 Messung der Thrombozytenkonzentration	71

3.2	Die CD34+Zellkonzentration unter dem Einfluß von G-CSF und unter Berücksichtigung von Geschlecht und Alter der Patienten	72
3.2.1	Untersuchung bezüglich des Patientengeschlechtes	72
3.2.1.1	Art des Anstiegs	72
3.2.1.2	Zeitpunkt des Maximums / Minimums	73
3.2.2	Gruppierung nach Alter	75
3.3	Die CD34+ Zellkonzentration unter dem Einfluß von G-CSF und unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Tumorerkrankungen	77
3.3.1	Craddock-Flood-Test zum Vergleich des Leukozytenanstiegs bei Neuroblastompatienten und anderen Tumoren	77
3.3.2	Craddock-Flood-Test zum Vergleich des CD34+ Zellanstiegs bei Neuroblastompatienten und anderen Tumoren	77
3.3.3	Untersuchung der Mobilisierungstypen I und II	78
3.3.4	Untersuchung der CD34+ Zellkonzentration auf absolute Maxima und Minima	78
3.4	Die CD34+ Zellkonzentration unter dem Einfluß von G-CSF und unter Berücksichtigung von Mobilisierungsdauer und G-CSF-Dosis	81
3.4.1	Untersuchung bezüglich der Mobilisierungsdauer in Tagen	81
3.4.2	Untersuchung bezüglich der G-CSF-Dosis pro Kilogramm Körpergewicht und Tag	83
3.5	Zusammenfassende Beantwortung der Fragestellung, Teil 1	84
4.	Diskussion	89
4.1	Optimierung des Apheresezeitpunktes	89
4.1.1	CD34+ Zellkonzentrationsverläufe	89
4.1.2	Prädiktionswerte für den CD34+ Zellanstieg	91
4.1.2.1	Die Leukozytenkonzentration als Prädiktionsparameter	91
4.1.2.2	Andere Parameter des peripheren Blutes als Prädiktionsparameter	94
4.2	Weitere Einflüsse auf die Mobilisierung von CD34+ Zellen nach G-CSF-Bolus	95
4.2.1	Diagnose	95
4.2.2	Geschlecht	96
4.2.3	Alter	97
4.2.4	Mobilisierung	97
4.3	Das klinische Stammzellmonitoring	98
4.3.1	Notwendigkeit und Voraussetzungen	98
4.3.2	Berücksichtigung des Mobilisierungstyps und des Patientengeschlechts	99
4.3.3	Möglicher Ablauf eines klinisch orientierten Monitorings	100
4.4	Zusammenfassende Beantwortung der Fragestellung, Teil 2	104

5. Zusammenfassung / Summary	105
6. Anhang	108
A) Abkürzungsverzeichnis	109
B) Übersicht der verwendeten Cluster of Differentiation-Kurzbezeichnungen	110
C) Individualdaten	111
7. Literaturverzeichnis	140
8. Danksagung	157
9. Lebenslauf	158
9. Ehrenwörtliche Erklärung	159

1. Einleitung

Die autologe Transplantation von peripheren hämatopoetischen Stammzellen im Rahmen einer Hochdosis-Chemotherapie hat sich inzwischen bei der Behandlung von Tumoren für bestimmte Indikationen im Kindesalter etabliert; in vielen Fällen ersetzt sie heute die ungleich aufwendigere Transplantation von Stammzellen aus dem Knochenmark. So ist es mit Hilfe der Stammzelltherapie gelungen, eine Realisierung neuer Strategien der Tumorbekämpfung, namentlich die Hochdosis-Chemotherapie, auch in der Kinderheilkunde einzuführen und zu standardisieren. Gerade für Kinder mit Tumor-Rezidiven und hochmalignen Tumoren ergeben sich hierdurch neue Chancen und Perspektiven einen kurativen Therapieansatz.

Der vorbereitende Schritt vor einer autologen Transplantation von peripheren Blutstammzellen im Rahmen einer Hochdosis-Chemotherapie ist die Mobilisierung der CD34+ Stammzellen. Mit Hilfe von gentechnisch hergestellten, den Mediatoren des menschlichen Körpers sehr ähnlichen Wachstumsfaktoren (G-CSF, GM-CSF, SCF), kann das Knochenmark zur Ausschüttung von pluripotenten Stammzellen der Hämatopoese ins periphere Blut stimuliert werden. Dies geschieht meist im Anschluß an eine Chemotherapie. In einem für den Patienten vergleichsweise wenig belastenden, wenngleich technisch aufwändigen Verfahren erfolgt die Apherese der Leukozyten aus dem peripheren Blut und die anschließende Herstellung des eigentlichen Transplantates. Dieses kann dem Patienten dann z.B. in der Folgezeit einer Hochdosis-Chemotherapie transplantiert werden.

Da diese Mobilisierung der Stammzellen aus dem Knochenmark und die anschließende Apherese Grundlage für das Gelingen einer Transplantation sind, gibt es viele Ansätze, dieses Verfahren zu modifizieren und sowohl qualitativ als auch quantitativ zu verbessern. Auf diesem Wege soll eine hohe Ausbeute an Stammzellen in möglichst wenig Apheresen erreicht werden.

Gerade bei pädiatrischen Patienten kann es jedoch zu Problemen bei der Mobilisierung und der Apherese der CD34+ Stammzellen kommen, die sogar das Gelingen einer Transplantation in Frage stellen können. Totales oder partielles Nichtansprechen der Hämatopoese und Stammzellausschüttung auf die Wachstumsfaktoren kann eine Transplantation verhindern und somit auch die durch eine solche gegebene Chance auf die Vernichtung der Tumorzellen im Rahmen einer Hochdosis-Chemotherapie nehmen. Im Sinne des Patienten gilt es daher, Bedingungen zu schaffen, welche die Mobilisation einer möglichst großen Zahl von Patienten mit hochgradigen Tumoren zulassen und eine Stammzelltransplantation bei all jenen Patienten ermöglichen, denen eine Hochdosis-Chemotherapie nützen kann.

1.1 Zeitgenössische Modellvorstellungen von der Hämatopoese

1.1.1 Strukturierte Analyse der hämatopoetischer Vorgänge

Da unser Wissen um die komplizierten Vorgänge während der Hämatopoese sowie um die Interaktionen der unzähligen Einflüsse auf die Entstehung des Blutes im Knochenmark die tatsächlich ablaufenden Vorgänge während der Hämatopoese wahrscheinlich nur grob skizziert, kommt man nicht umhin, eben jene Vorgänge in einfache Modelle und Betrachtungsweisen zusammenzufassen. In Anlehnung an den Versuch von Elfenbein et al (Elfenbein GS et al.), ein solches Modell der Hämatopoese auf dem Boden der Mathematik aufzustellen, kann man die Stimulation der CD34+ Stammzellen in vivo in einem Diagramm mit drei Dimensionen wiedergeben, wobei jede der drei Achsen einen der drei Hauptparameter bezeichnet, welche die Reaktion des menschlichen Körpers auf eine Stimulation der Hämatopoese zumindest teilweise darstellen könnte. Dies sind namentlich:

- a) Die Konzentration an G-CSF im Blut des Patienten (endogene und exogene Zufuhr) als Indikator für die Stimulation,
- b) die Menge an CD34+ Zellen im peripheren Blut und im Knochenmark als Maß des Stimulationserfolges, und
- c) als vielleicht größte Einflußgröße auf den Erfolg einer Stimulation mit G-CSF all jene Einflußgrößen, die man unter dem Begriff "Microenviroment " zusammenfaßt. Das "Microenviroment" wird dabei definiert als die zellulären Elemente des Knochenmarkstromas einschließlich deren Oberflächenmoleküle, sowie der nicht zellulären Elemente des Stromas einschließlich aller löslichen und nichtlöslichen Zellprodukte desselben.

Unter dieser Voraussetzung ist also die Darstellung einer Stimulationssituation im Patienten bei Kenntnis aller Parameter in Form eines Diagrammes mit drei Dimensionen vorstellbar. Jeder aktuellen Situation in einem individuellen Patienten wäre genau ein Punkt mit drei Koordinaten zuzuweisen, welcher den Stimulationserfolg anzeigte. Da eine Messung von Qualität und Quantität des "Microenviroments" nicht möglich ist, kann die Darstellung nur in relativer Form erfolgen. Dann wird auf der X-Achse die absolute oder relative Anzahl der Stammzellen aufgetragen, auf der x-Achse die G-CSF-Konzentration. Die z-Achse zeigt die relative Fähigkeit des Knochenmarkes an, die

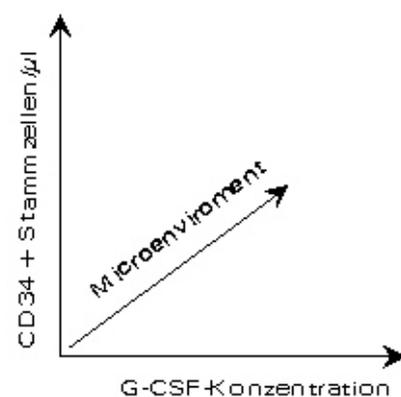


Abb. 1.1 Darstellung der Hämatopoese als Diagramm mit drei Achsen als zeitgenössische Modellvorstellung.

Hämatopoese zu unterstützen. In einem solchen Modell existiert für jeden der drei Parameter eine Dosis-Wirkungskurve, solange die anderen beiden Parameter konstant gehalten werden. Der Verlauf dieser Kurve ist nicht voraussagbar, dennoch ermöglicht die Darstellung eine Einordnung der aktuellen Stimulationssituation im Patienten, und verdeutlicht die derzeit existierende

Vorstellung über den "steady state" der Hämatopoese, und die Grundlagen dessen Beeinflussung .

Da das Verständnis dieser drei Einflüsse (Wachstumsfaktor, CD34+ Stammzelle und Einflüsse des Mikroenviroments) Voraussetzung für die Optimierung der Mobilisierung CD34+ Zellen ist, sollen sie im folgenden kurz dargestellt und erläutert werden.

1.1.2 Übersicht über die Hämatopoese

Das Blut als flüssiges Organ ist in seiner Gesamtheit in einen ständigen Umbauprozess eingebunden, der weithin als Hämatopoese zusammengefasst wird. Dieser Prozess umfasst die Proliferation, Differenzierung, Funktion und das Absterben von Blutzellen unterschiedlicher Linien, die sich wiederum nach Morphologie, Funktion und auch nach genetischen Gesichtspunkten unterteilen lassen.

Ca. 1 Billion täglich neugebildete Zellen (in einem ca. 70 kg schweren männlichen adulten Probanden), davon 200 Milliarden Erythrozyten und 70 Milliarden Granulozyten, verweisen deutlich auf das enorme Potential dieses kontinuierlichen Erneuerungsprozesses (Dancey JT et al. 1976). Bei der Frage nach dem Ursprung dieser Zellenflut führt die Literatur direkt zu den pluripotenten Stammzellen (Ogawa M 1993). Stammzellen, definiert als Zellen, welche die Langzeitblutbildung, gegebenenfalls auch die Kurzzeitblutbildung von Empfängern wieder herstellen können. Sie sind, im Gegensatz zu den ausdifferenzierten Blutzellen, zur Selbsterneuerung im Sinne einer Proliferation fähig. Eine kurzzeitige Regeneration der Hämatopoese kann durch die Differenzierung der Progenitorzellen zu den einzelnen Zellreihen erreicht werden.

Proliferation ist definitionsgemäß die Wucherung von ganzen Geweben (lat. proles: Nachkommen, ferre: bringen) , also eine durch Zellteilung einzelner Zellen bewirkte Volumen- bzw. Zellzahlzunahme eines gesamten Gewebes.

Die Differenzierung hingegen bezeichnet einen die individuelle Zelle betreffenden Prozess der Entwicklung, welcher sich durch eine Änderung von Zellfunktion und Morphologie ausdrückt und wohl am ehesten einer Ausreifung im Sinne einer Spezialisierung entspricht (Müntefering et al 1995).

Proliferation und Differenzierung der Stammzellen sind also die Grundlage für die nahezu unerschöpfliche Regeneration des Zellpools im Knochenmark. Die Suche nach Antworten auf die Frage, in welcher Weise nun die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung der Stammzelle gehalten wird, führt unweigerlich zu einer Reihe von Modellen, welche die Regulation der Hämatopoese zu erfassen versucht haben.

Während das induktiv-deterministische Modell (Curry, Trentin 1967, Curry et al 1967a, Curry et al 1967, Trentin 1970, van Zant et Goldwasser 1979) von einer Beeinflussung und Regulation der Proliferation und Differenzierung der Stammzellen durch exogene Faktoren ausgeht, und durch die Einführung der These über die Mitbeeinflussung durch das sog. Microenviroment noch erweitert wurde, gehen Till und McCulloch (1980) von einem rein zufälligen Prozess aus. Dass diese Wahrscheinlichkeiten, mit denen der Zufall in der ein oder anderen Weise auf die

Zellenentwicklung einwirkt, durch Prozesse von außen variiert werden können, legt das Dexter-Modell von 1987 (Dexter 1987) nahe. Man kann heute davon ausgehen, dass eine Kombination der beiden Grundvorstellungen, namentlich des deterministischen und stochastischen Modells, am ehesten einen Eindruck von dem wiederzugeben vermag, was in vivo tatsächlich geschieht.

1.1.3 Der Stammbaum der regelrecht ablaufenden Hämatopoese

Die Ausgangszelle der Entwicklung aller Blutzellen im menschlichen Körper wird als die omnipotente Stammzelle bezeichnet. Diese besitzt die Fähigkeit zur Reduplikation und zur Differenzierung. Sie bildet den unsterblichen Klon von Stammzellen, der die Regeneration des Organes Blut aufrecht erhält. Die Ausdifferenzierung dieser omnipotenten Zelle führt zu den beiden Reihen pluripotenter Stammzellen, welche bereits die Gesamtheit der Blutzellen in eine myeloische und lymphatische Reihe gliedern. Durch weitere Aufgliederung sowie durch Differenzierung in die unterschiedlichen Progentorzellen wird schließlich die Produktion jeglicher benötigter Blutzellen ermöglicht.

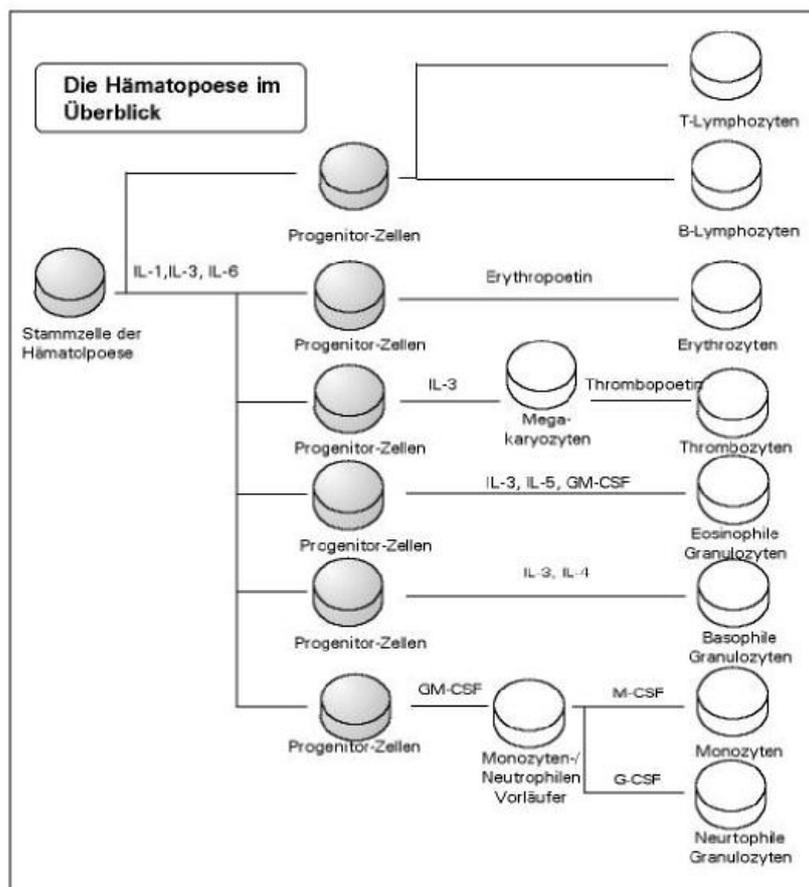


Abb. 1.2 Vereinfachte schematische Darstellung der Hämatopoese, ausgehend von der pluripotenten Stammzelle bis hin zu den ausdifferenzierten Zellen des peripheren Blutes unter Darstellung einiger bedeutender wachstumsbeeinflussender Substanzen.

Die Proliferation des Blutes wird unter anderem durch den Einfluß von Wachstumsfaktoren bestimmt, von denen vier in besonderem Maße die Hämatopoese bestimmen: G-CSF stimuliert relativ spezifisch die neutrophilen Granulozyten, M-CSF die Makrophagen und Monozyten. IL-3 und GM-CSF stimulieren beide genannten Zelltypen. Weitere Wachstumsfaktoren sind SCF, EPO sowie TPO/MGDF. Als zelluläre Basis der unter dem Begriff Hämatopoiesis zusammengefassten Entwicklung ist die CD34 positive Stammzelle zu sehen, die etwa 0,4% der gesamten hämatopoetischen Zellen ausmacht (Hall, Watt 1989).

1.2 Die CD34 positive Stammzelle

1.2.1 Zytologische Betrachtung der CD34+ Stammzelle

Die CD34+ Stammzelle unterscheidet sich sowohl morphologisch als auch immuncharakteristisch bei ihrem Auftreten im peripheren Blut von der im Knochenmark. In der Färbung nach Papenheim zeigen sich im peripheren Blut homogene, gleichgroße, runde lymphozytenähnliche Zellen, während die Zellen im Knochenmark unterschiedliche Größen aufweisen. Die Kerne der Zellen erscheinen leicht eingekerbt, violett-blau und zeigen ein bis zwei Nucleoli. Der schmale Zytoplasmasaum färbt sich basophil dunkelblau.

Morphe:

Zellfläche im peripheren Blut:	92,12 +/-7,8 μm^2
Durchmesser im peripheren Blut:	10,3 +/-0,4 μm
Zellfläche im Knochenmark:	120 +/- 29 μm^2
Durchmesser im Knochenmark:	12 +/- 1,6 μm

Kern-Plasma-Relation (Zytospin)

peripheres Blut	0,69
Knochenmark	0,62

(nach Tiehle J et al 1995)

Die Myeloperoxidase-, Saure Phosphatase-, Naphtol AS-D Chloroacetat- und Alkalische-Phosphatase-Färbungen fallen negativ aus. Anfärbbarkeit zeigt sich bei Alpha Naphtol Acetat Esterase in 5% der Zellen im peripheren Blut, bei fehlender Anfärbbarkeit der Zellen im Knochenmark. Die β -Glucuronidase-Färbung zeigt eine Anfärbbarkeit von 95% der Zellen sowohl im Knochenmark als auch im peripheren Blut. In der PAS-Färbung bleiben die Zellen unangefärbt (Drebber U, 1998).

Immunhistochemisch lassen sich auf den CD34+ Zellen des Knochenmarkes und des peripheren Blutes u.a. folgende Oberflächenantigene nachweisen (aufgelistet wurden nur solche, die in mehr als 5% aller CD34+ Zellen vorkommen):

Vorkommen auf CD34+ Zellen (%)	auf Zellen im peripheren Blut	auf Zellen im Knochenmark
90 - 100 %	CD34, CD45, CD43	CD34, CD45, CD43
20 - 30 %	CD45RA, CD11a, CD11c	Ret40f
10-15 %	CD15	CD20, CD11a, PCNA
5-8%	RET40f, CD20	CD15, CD45RA, CD45RO, CD11c

Tab.1.1 Darstellung der relativen Häufigkeit von ausgewählten Oberflächenmarkern auf CD34+ Zellen des peripheren Blutes und des Knochenmarks (nach Tiehle J et al 1995)

Des Weiteren exprimieren mehr als 95% der CD34+ Zellen des Knochenmarks HLA-DR, und bis zu 74% sind positiv für CD18. Dabei stellen sich die CD34+/CD18- Zellen als kleine, agranuläre Lymphozyten dar, welche den Großteil der Kolonien in Langzeit-Kulturen bilden, während die CD34+/CD18+ Zellen wesentlich größer sind, und vor allem in Kurzzeitkulturen vorherrschen. CD34+ Stammzellen, die das CD86 Antigen ebenfalls exprimieren (ein natürlicher Ligand des T-Zell-Aktivierungsmoleküls CD28), weisen eine alloantigenpräsentierende Funktion auf (Rondelli D et al 1996). Die aus dem Knochenmark stammenden CD34+ Zellen weisen zudem gegenüber den CD34+ Zellen anderer Herkunft einen hohen Prozentsatz an CD19+ Zellen auf, im Gegensatz zu anderen Zellquellen wie peripherem Blut oder Nabelschnurblut (Van Epps DE et al, 1994).

Im Zellzyklus zeigen sich Unterschiede zwischen Knochenmark und peripherem Blut. Nach der Stimulation mit G-CSF befinden sich signifikant mehr CD34+ Zellen im peripheren Blut in der G₁-Phase (80%) als im Knochenmark selbst (60%). Der Anteil der Zellen in G₀-Phase ist jedoch in Knochenmark und Blut gleich. (Lemoli RM et al. 1998).

1.2.2 Das CD34 Oberflächen-Antigen

Das CD34 Oberflächenantigen hat in der Stammzellforschung nach wie vor einen besonderen Stellenwert und ist zur Zeit das in der Praxis wichtigste Merkmal der hämatopoetischen Stammzellen. Ausschließlich auf multi- und pluripotenten Vorläuferzellen ausgeprägt, ermöglicht es eine eindeutige Differenzierung zwischen ausgereiften Leukozyten und Vorläuferzellen - eine absolute Voraussetzung für die Charakterisierung, Selektion und den therapeutischen Einsatz von Stammzellen in der Hämatologie und Onkologie (Berenson RJ et al. 1988).

Bei dem Transmembranmolekül der Klassifizierung CD34 handelt es sich um ein die Zellmembran einfach passierendes Glykoprotein vom Typ I. Das Molekulargewicht des Moleküls ist abhängig vom seinem Reduktionszustand und schwankt zwischen 110 und 120 Kilodalton. Einen besonderen Einfluß auf das Molekulargewicht hat auch die Ladung des CD34-Rezeptors, welche maßgeblich durch Besetzung der Glykosylierungsstellen beeinflusst wird. Für den natürlichen Zustand des Moleküls

ergibt sich daraus folgend ein Molekulargewicht von 116 kD, während ein CD34-Molekül, bei dem alle Glykosylierungsstellen voll besetzt sind, ein Molekulargewicht von 150 kD hat (Greaves MF et al 1992; Sutherland DR et Keating A 1992). Der Proteinanteil des Moleküls besteht aus einer Kette von 385 Aminosäuren; ausgehend von NH₂-terminalen Ende des Moleküls schließen diese auf der Außenseite der Zellmembran neun Stellen zur N-Glykosylierung und eine nicht näher bestimmte Zahl an Stellen zur O-Glykosylierung ein. Es wird weiterhin ein kleines CD34 Molekül beschrieben, dessen intrazellulärer Teil verkürzt, bei dem der extrazelluläre Anteil jedoch unverändert ist. Dieses kleinere CD34 Oberflächenmolekül hat einen Proteinanteil aus 323 Aminosäuren und liegt mit 100 kD unter dem ermittelten minimalen Molekulargewicht des längeren CD34 Moleküls. Die vollständige Form des CD34+ Moleküls besitzt eine intrazelluläre Domäne, welche diverse Phosphorylierungsstellen aufweist, während diese bei der verkürzten, rudimentären Form fehlen (Lanza F et Piacibello W). Alle hämatopoetischen Progenitorzellen, sowohl omni- wie auch pluripotente, exprimieren das CD34-Molekül an ihrer Zelloberfläche. Erst bei weiterer Ausdifferenzierung nimmt die Expressierung des CD34-Moleküls ab, bis schließlich kein CD34-Molekül mehr an der Oberfläche der weiter ausgereiften Zellen nachzuweisen ist. Diese Zellen werden sodann als CD34 - (negativ) bezeichnet. (Civin CL et Gore SD 1993).

Die Expressierung des zuerst mit dem monoklonalen My10-Antikörper identifizierte CD34-Molekül wird mit 1-4 % der Zellen im menschlichen Knochenmark (Catlett 1991, Auditore-Hargreaves et al 1994), mit 3,8 Zellen pro µl im peripheren Blut und mit weniger als 0,2% der Leukozyten des peripheren Blutes (Bender et al 1991, Kato et Radbruch 1993) angegeben.

Die physiologische Bedeutung und Funktion des CD34 Moleküls ist bisher noch nicht hinreichend aufgeklärt; aufgrund seiner Bindungskapazität für CD62L und CD62E Moleküle, die als Adhäsionsmoleküle der Anhaftung von Leukozyten an die Wand von Blutgefäßen und Lymphgefäßen dienen, währe eine funktionelle Bedeutung als Haftstelle zur Bindung der CD34+ Stammzellen an das Knochenmarkkompartiment denkbar. So scheint das CD34 Molekül verschiedene Funktionen in der Interaktion zwischen Stammzelle und Microenviroment des Knochemarks, insbesondere bei der Adhäsion von Stammzelle und Knochemarksstroma zu erfüllen (Healy L at al 1995). Auch die Experimente mit CD34 defizienten Mäusen lieferten nur wenig Hinweise, da zwar die Hämatopoese bei diesen Tieren zunächst langsamer von statten ging, sich die Tiere jedoch letzen Endes völlig normal entwickeln konnte (Cheng J et al. 1996). Im Vergleich zu normalen Mäusen unterschieden sich die Mutanten weder in der Regenerationsfähigkeit des Blutes, noch in der Histologie/Zytologie von Knochenmark und peripherem Blut.

Des weiteren wird das CD34 Molekül nicht nur auf lympho-hämatopoetischen Stammzellen exprimiert, sondern auch auf den Endothelien kleiner Gefäße (mikrovaskuläre Zellen), auf einer Fibroblasten-Untergruppe, im Knochenmark, auf Stroma-Progenitor-Zellen und auf Zellen im fetalen und adulten Nervensystem. Gesichert ist auch das Vorkommen auf Stromazellen des humanen Fettgewebes (Gronthos S et al 2001), auf Zellen der Lebersinusoide (Daneker GW 1998), sowie auf sog. Natürlichen Suppressorzellen (Sugiura K, 1998). Nachgewiesen werden konnte zudem die Beteiligung von CD34 auch für die Blutbildung im fetalen

Dottersack, in der embryonalen Leber und in einigen nicht direkt an der Blutbildung beteiligten Geweben bei 5 Wochen alten Embryonen.

Da die CD34 Expression reziprok zur Expression von Adhäsionsmolekülen in auf Gefäßendothel nachzuweisen ist, sind größere Gefäßendothelien eher CD34 negative, Endothelien in Kapillaren CD34 positiv. (Delia D et al 1993). Aus der oben stehenden Auflistung ergibt sich, daß auch Tumorzellen in der Lage sein können, CD34 zu exprimieren, wie z.B. für die chronischen myeloischen Leukämie in der Blastenkrise nachgewiesen (Favre G et al 1998) ist.

1.2.3 Das CD45 Oberflächenantigen

Beim CD45 Oberflächenantigen handelt es sich um einen großen, mehrfach glycosylierten transmembranen Polypeptidkomplex, der in seiner Ausprägung als spezifisch für kernhaltige Zellen der Hämatopoese anzusehen ist (Symons A et al 1999). Die Expression des panleukozytären CD45 Oberflächenantigens ist dabei vom Entwicklungsstadium der Zelle abhängig und nimmt, nach einem Initialstadium, mit Abnahme der CD34-Rezeptoren stetig zu (Loken MR et al 1988).

Durch Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern konnten mehrere Untereinheiten des Rezeptors identifiziert, sowie deren Vorkommen auch innerhalb der Granulozytengranula nachgewiesen werden (Pulido R et al. 1989). Der zytoplasmatische Anteil des auch als leukocyte common antigen (LCA) bezeichneten Oberflächenantigens scheint eine Thyrosinphosphatase-Aktivität zu besitzen (Charbonneau H et al 1988) und zur Signaltransduktion beizutragen. Die extrazellulären Domänen weisen eine Mucin-artige Region, eine Cystein-haltige Region und eine Region aus drei Fibronectin-Typ II Domänen auf (Symon A et al 1999).

Funktionell ist das CD45-Molekül über ein assoziiertes 33 kDa-Protein an der Aktivierung von T-Lymphozyten beteiligt, wie mit Hilfe der Inhibition von Phytohemagglutinin (PHA) nachgewiesen werden konnte (Bernabeu C, 1987).

Da das CD45 Oberflächenantigen auf allen Leukozyten exprimiert wird, kann es in Kombination mit weiteren zellspezifischen Marken wie dem oben beschriebenen CD34 Oberflächenmolekül sowie den Zelleigenschaften (Zellgröße, Zellgranularität) zur Identifizierung von Zellen genutzt werden.

1.3 Granulocyte-Colony Stimulatin Factor (G-CSF)

1.3.1 Physiologischer und pharmakologischer G-CSF

Granulocyte-colony stimulating Factor (G-CSF) ist ein Glykoprotein mit 18-22 kD Molekülmasse, dessen Genort auf Chromosom 17q11.2-21 lokalisiert wurde. Es besteht aus 174 Aminosäuren und ist bei Thr 133 glykosyliert, wobei die Zuckerketten aus α -N-Actyl-Neuraminsäure, β -Galactose und N-Acetyl-Galaktosamin bestehen (Groopman 1989, Platzer 1989, Asano 1991). Die Bildung und Ausschüttung des Faktors erfolgt durch mononukleäre Zellen im Knochenmark und in der Blutbahn. Hieran beteiligt sind insbesondere das endotheliale Knochenmarksstroma durch Interleukin-1-Stimulation, die Monozyten durch Interleukin 3-, Interferon- und Lipopolysaccharid-Stimulation, sowie die Fibroblasten nach Tumor-Nekrose-Faktor-Stimulation. Dabei unterliegt die physiologische Ausschüttung von G-CSF einer circadianen Rhythmik, welche ein Maximum um 22 Uhr und ein Minimum von G-CSF im Blut um 8 Uhr morgens aufweist (Jilma B et al 1999).

Die Wirkung von G-CSF wird über eine Interaktion mit G-CSF-Rezeptoren auf den Zielzellen des Knochenmarks ausgelöst. Der G-CSF-Rezeptor, der auf neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden kann, besteht aus 759 bis 812 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 100 bis 150 kD. Pro neutrophilem Granulozyten ist mit ca. 3000 Zelloberflächenrezeptoren zu rechnen (Demetrie GD et Griffin JD 1991, Khwaja A et al 1993). G-CSF bindet an den entsprechenden Rezeptor in einer tetrameren Anordnung; jeweils 2 G-CSF und zwei Rezeptor-Moleküle bilden einen solchen Komplex (Aritomi M 1999, Layton JE 1999). Nach der Bindung wird der Rezeptor-G-CSF-Komplex in die Zelle internalisiert, der weitere Signalweg verläuft vermutlich über Janus-Kinasen und STATs (signal Transducer and Activators of Transcription). Dabei werden mindestens 3 verschiedene STATs aktiviert (STAT1 und STAT5 über die membran-proximale Rezeptorregion, STAT3 über die membran-distale Region). Die Ausschüttung von hämatopoetischen Stammzellen ins Knochenmark hingegen wird wahrscheinlich über den VLA-4-Rezeptor geregelt, dessen Affinität in der G-CSF-gestützten Knochenmarkserholung im Vergleich zum Steady-State-Status signifikant reduziert ist, wobei sich die Zahl der zirkulierenden CD34+ Zellen im peripheren Blut umgekehrt proportional zum Aktivierungszustand des VLA-4-Rezeptors darstellt (Lichterfeld et al 2000).

Für die pharmazeutische Anwendung liegt G-CSF in zwei unterschiedlichen Formen vor, namentlich als glykosyliertes (Lenograstim) und als nicht-glykosyliertes G-CSF (Filgrastim). Filgrastim wird rekombinant mit Hilfe von *Escherichia coli* Bakterien produziert, Lenograstim wird gentechnisch in Ovarzellen des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) hergestellt. Über die in-vivo Auswirkungen von Lenograstim, dem glykosylierten, und Filgrastim, dem nicht-glykosylierten G-CSF, stehen sich widersprüchliche Aussagen gegenüber. Gesichert ist, daß die Glykosylierung grundsätzlich für viele Moleküle einen ausgeprägten Effekt auf deren Wirksamkeit, Verarbeitung, Umwandlung oder Entsorgung hat. Dies wurde auch schon für einige andere Wachstumsfaktoren der Hämatopoese, namentlich Erythropoetin und GM-CSF (Fukuda M et al. 1989, Cebon J et al 1990) nachgewiesen. Mehrere Studien sprechen Lenograstim einen Vorteil bei der Stimulation von CD34+ Stammzellen in

in vitro und in gesunden Probanden zu (Nissen C et al 1990, Kishita M et al 1992, Höglund M et al 1996). Vor allem durch in-vitro-Versuche konnte gezeigt werden, dass die glykosylierte Form stabiler (Asano S 1991, Kishita M et al. 1992), und auch potenter in Bezug auf ihre Stimulationsfähigkeit ist (Nissen C et al. 1990). Diese Beobachtungen haben sich in vivo anhand von Studien an gesunden Probanden teilweise bestätigt (Höglund M et al. 1996, Höglund M et al 1997). Andere Untersuchungen weisen keinen signifikanten Unterschied für die Anwendung von glykosyliertem und nicht glykosyliertem G-CSF auf (Lefrere F et al 1999). Der Unterschied des Mobilisierungspotentials beider Substanzen bei gesunden Menschen ist aber in jedem Fall als so gering einzustufen, dass er bei dem größten Anteil der Patienten überhaupt nicht, und bei den schwer stimulierbaren wahrscheinlich nur gering ins Gewicht fällt (Watts MJ et al 1997).

1.3.2 Pharmakodynamik und Wirkung

G-CSF wirkt direkt auf die neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut ein. Bekannt ist eine erhöhte Expression von HLA-DR-, CD34-, CD14- und CD71-Oberflächenantigenen auf diesen bei einem gleichzeitigen Abfall der Expression von CD10, CD15 und CD16, parallel zu den G-CSF-Plasmakonzentrationen (Zarco MA et al 1999). Im Rahmen einer einmaligen Stimulation mit G-CSF steigt die Zahl der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut innerhalb von 90 Minuten an, wobei sich ein Konzentrationsmaximum nach etwa 12 Stunden findet, mit einem Konzentrationsrückgang nahe dem Ausgangswert innerhalb von etwa 48 Stunden. Bei Kindern kommt es ca. 4-12 Stunden nach s.c. G-CSF-Bolusgabe zu einem Maximum der neutrophilen Granulozyten im Blut (Stute et al 1992). Bei niedrigen Dosen G-CSF (75 bis 300 µg/Tag) verläuft der Anstieg und die Höhe des Maximums dosisabhängig (Borleffs JC et al. 1998). Weiterhin bewirkt G-CSF neben einer rein quantitativen Vermehrung der Granulozyten in vitro auch eine verbesserte Phagozytosefähigkeit normaler neutrophiler Granulozyten gegen Bakterien, nicht jedoch gegen Pilze (Roilides E et al 1991). G-CSF wirkt sich steigernd auf die Ausschüttung von IL-2 Rezeptorantagonisten und Tumor Nekrosefaktor (TNF) aus. Außerdem verzeichnet man eine Veränderung der physiologischen Schlafmuster mit einer Verkürzung der Tiefschlafphase (mit Delta-Wellen im EEG) unter dem Einfluß von G-CSF (Schuld A et al 1999).

Man nimmt an, dass die Wirkung von G-CSF zur Mobilisierung der Stammzellen vor allem auf den Verlust wichtiger Adhäsionsmoleküle zurückzuführen ist, die der Zelle physiologischer Weise einen Verbleib im Knochenmark erlaubt. Diskutiert werden hierbei z.B. VLA-4, LFA-1 und LFA3 (To LB et al 1997). Für die Wirkung von G-CSF auf die Stammzellen scheint weniger die maximale Konzentration des Wachstumsfaktors im peripheren Blut entscheidend zu sein, als vielmehr die dauernde Anwesenheit im Blut. Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass nur ein kleiner Anteil der zellulären Rezeptoren für die Wachstumsfaktoren besetzt sein muss, um eine Wirkung an der Zelle zu vermitteln (Park LS, Urdal DL, 1989).

Neben der beschriebenen Wirkung auf die Mobilisierung der neutrophilen Granulozyten wird ein Einfluss von G-CSF auf das Gerinnungssystem beschrieben. G-CSF-Rezeptoren lassen sich auf Megakaryozyten und auf Thrombozyten nachweisen, in

einzelnen Fallbeschreibungen werden Fälle von Hyperkoagulopathien bei gesunden Spendern peripherer Stammzellen gefunden (Kanaju T 1995, Shimoda K 1993, Anderlini P 1997a).

Ein weiterer Hinweis auf vielfältige physiologische Wirkungen von G-CSF ist die Verfünffachung der pre-DC2-Zellen im peripheren Blut nach G-CSF-Gabe. Pre-DC2-Zellen (CD4+, CD11c-, IL-3R α +) gehören zur Reihe der dendritischen Zellen und initiieren die Differenzierung von Lymphozyten zur Reihe der TH2 Zellen (Arpinati et al 2000).

1.3.3 Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik von rekombinantem G-CSF ist vielfach untersucht worden, dabei mehrfach auch an pädiatrischen Patienten. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Plasmakonzentration von G-CSF dosisabhängig ist, und dass der Modus der Gabe den Verbleib im Blut bestimmt. Nach einer subcutanen Bolusgabe von G-CSF folgt die sofort einsetzende Resorption des Wachstumsfaktors einer Kinetik 0. Ordnung. Das Konzentrationsmaximum im Plasma findet sich bei pädiatrischen Patienten nach 4 bis 12 Stunden (Stute et al 1992), bei adulten eher 4 bis 8 Stunden nach dem G-CSF-Bolus (Layton JE et al. 1989, Eguchi K et al. 1990). Bei der subcutanen Applikation wird jedoch nicht die volle Bioverfügbarkeit erreicht, da ein Teil der Proteine bereits in der Haut durch lokale Proteasen abgebaut wird. Dennoch ist die Pharmakodynamik von G-CSF nach subcutaner Gabe für die Stammzellmobilisierung besser geeignet als nach intravenöser (Rosenfeld CS et al 1991). Dieser Effekt ist über eine zu schnelle Elimination bei intravenöser Gabe, und ein Depot-Effekt mit langsamer, kontinuierlicher Abgabe von G-CSF aus dem subcutanen Fettgewebe erklärbar. Dabei liegt bei subcutaner Injektion die Halbwertszeit bei ca. 3,5 Stunden, mit einer Bioverfügbarkeit von 50-80% (Zeller et al. 1996).

Die Dosierung von Filgrastim wird in der Neuroblastomstudie NB97 mit 5 μ g/kg je Tag ab Tag 8 nach Beginn von Block N5, bzw. 5 μ g/kg je Tag ab Tag 9 nach Beginn von Block N6 bei subcutaner Gabe angegeben. In der Vorbereitung der Stammzellsammlung nach Block 5 oder 6 der Studie wird eine Dosierung von 1-2x 10 μ g/kg pro Tag subcutan vorgegeben. Über 10 Tage nach Ende der Chemotherapie hinweg steigt die Plasmakonzentration von G-CSF an, wobei die Höhe der Plasmagipfels sowohl an Tag 1 wie auch an Tag 10 mit der Tagesdosis korrelierten. Demgegenüber steht jedoch eine verglichen mit Tag 1 wesentlich höhere Clearance (0,57 ml/min/kg an Tag 10, 0,31 ml/min/kg an Tag 1) von G-CSF aus dem Plasma an Tag 10 (Stute et al 1992, Kawano et al 1999). Dabei wirkt sich die erhöhte Clearance bei pädiatrischen Patienten noch viel stärker aus als bei adulten Patienten (Kawano et al. 1999). So verläuft der Abfall der G-CSF-Konzentration im Serum von pädiatrischen Patienten mit fortschreitender Stimulation steiler als bei einer adulten Vergleichsgruppe. Die Eliminierung von G-CSF erfolgt vermutlich zu einem großen Teil über die Endozytose rezeptorgekoppelter Moleküle an Leukozyten, im Urin von Patienten mit Dosen von bis zu 60 μ g/kg G-CSF bei intravenöser Injektion war kein G-CSF nachzuweisen (Petros WP, 1992).

G-CSF sollte bei intravenöser Gabe nicht mit anderen Substanzen gemischt werden, wobei Filgrastim mit 5% Glucose kombiniert werden kann. Bei Konzentrationen von weniger als 15 µg/ml sollte der Infusion Albumin hinzugegeben werden, um einer Adsorption des Wachstumsfaktors an der Wand des Behälters vorzubeugen. Von Verdünnungen auf Konzentrationen von unter 2 µg/ml wird abgeraten (Petros WP, 1992).

1.3.4 Nebenwirkungen

Neben den meist auftretenden Nebenwirkungen grippeartiger Natur wie Fieber, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Knochenschmerzen und Muskelschmerzen kann es auch zu Diarrhoe, Übelkeit und Erbrechen kommen. Relative Kontraindikationen sind, aufgrund der myeloproliferativen Wirkung, maligne myeloische Grunderkrankungen, bei denen G-CSF das Wachstum von malignen Zellen potentiell fördern könnte. (Karow T, Lang R 2001).

Insbesondere für die Knochenschmerzen ist eine direkte Abhängigkeit von der Dosis bei gesunden Erwachsenen nachgewiesen worden, bei denen die Knochenschmerzen nur in der Gruppe mit 10 µg/kg/d G-CSF auftrat, nicht jedoch in der Vergleichsgruppe mit 5 µg/kg/d (Dreger P et al 1994).

1.4 Klinik und Therapie pädiatrischer Tumorerkrankungen

1.4.1 Tumoren im Kindesalter

Grundsätzlich kann eine Vielzahl von Tumoren, die auch aus der Pathologie des erwachsenen Menschen bekannt sind, im Kindesalter auftreten. Aus der Entwicklungsphysiologie des kindlichen Körpers ergeben sich jedoch besondere Umstände, welche die Ausbildung und das Wachstum typisch pädiatrischer Tumoren ermöglichen. Zu den häufigsten Tumoren im Kindesalter zählen an erster Stelle Leukämien (lymphoblastische und nicht-lymphoblastische), an zweiter Stelle bösartige Neubildungen des zentralen Nervensystems (z.B. Medulloblastom, Astrozytom, Retinoblastom), des weiteren Lymphome (M.Hodgkin sowie Non-Hodgkin-Lymphome), Neuroblastome, Wilms-Tumoren, Knochentumoren (Osteosarkom, Ewing-Sarkom), Weichteilsarkome (Rhabdomyosarkom u.a.), und Tumoren mit Ursprung in der Keimbahn.

Da die in dieser klinischen Studie untersuchten Patienten nur einen Ausschnitt dieses Spektrums als Grunderkrankung aufwiesen, soll im folgenden kurz auf die fünf betreffenden Tumorerkrankungen eingegangen werden.

	Tumor	pro 1 Mio Kinder
Tumoren dieser Studie	Neuroblastom	13
	Knochentumoren (Osteosarkom, Ewing-Sarkom)	6
	Weichteilsarkome (Rhabdomyosarkom, PNET)	9
	Non-Hodgkin-Lymphom	9
	Andere Tumoren im Vergleich	Leukämien
	Hirntumoren	28
	Teratom	17
	Wilms-Tumoren	9
	Retinoblastom	3

Tab. 1.2 Inzidenzen der wichtigsten Tumorerkrankungen im Kindesalter nach Angaben des Kinderkrebsregister Deutschland (Mainz), Jahresbericht 2002

1.4.1.1 Das Neuroblastom (ICD-10: C74.9)

Das Neuroblastom ist ein hochmaligner Tumor, der zu den häufigsten Tumoren im Kindesalter gehört und szintigraphisch nachweisbar (^{131}J) Metaiodbenzylguanidin speichert (Riede UN, Saeger W, 1995). Das Neuroblastom ist ein in der Nebenniere oder den abdominalen Ganglien, evt. auch im Thorax vorkommender Tumor, und zudem eine der häufigsten malignen Erkrankungen im frühen Kindesalter, mit einer leicht erhöhten Häufigkeit bei hellhäutigen Kindern. Die jährliche Inzidenz liegt bei etwa 1/100000 Kindern unter 15 Jahren. 25 % der Neuroblastome werden bei Kindern gefunden, die ihr erstes Lebensjahr noch nicht beendet haben; 40% bei Kindern unter 2 Jahren, und 90% bei Kindern unter 10 Jahren. Somit kann man sagen, dass es sich beim Neuroblastom um einen typischer Tumor des frühen

Kindesalters handelt. Das Neuroblastom tritt beim männlichen Geschlecht leicht gehäuft auf, die Rate männlich/weiblich beträgt etwa 1.2 : 1. Obgleich das Neuroblastom mit keiner bekannten kongenitalen Anomalie in Verbindung gebracht und keinem genetischen Syndrom zugeordnet wird, kommt es mitunter gemeinsam mit anderen Fehlbildungen vor. Es sind jedoch Fälle bekannt, in denen der Tumor in Familien gehäuft aufgetreten ist. Die Pathogenese beruht auf der pathologischen Weise erhaltenen Teilungsfähigkeit von neuronalen Zellen im vegetativen Nervensystem. Daher findet man die meisten Neuroblastome im Sympathikusgewebe, und hier vor allem im Abdomen. Ihrer Zuordnung nach gehören Neuroblastomzellen zur Zellgruppe des APUD-Systems (englische Abkürzung für amin precursor uptake and decarboxylation, periphere endokrine Zellen also, die zur Aufnahme und Decarboxylierung von Aminvorstufen fähig sind. Neuroblastome können bei bis zu 1,5% aller Kinderobduktionen nachgewiesen werden, wohingegen die Zahl der tatsächlichen Manifestierungen wesentlich niedriger ist. Dies legt den Schluß nahe, das ein Teil der Neuroblastome sich im Verlauf der kindlichen Entwicklung wieder zurückbildet. Untersuchungen unterstreichen diese Spontanheilungs-These, da sie Neuroblastomzellhaufen bereits in der Embryonal- und Fetalentwicklung des Kindes im Nebennierenmark nachweisen können (mit einem Gipfel der Knotenzahl um die 20 SSW), welche sich im weiteren Verlauf der embryonalen Entwicklung zurückbilden, um in den ersten Lebenswochen in Folge von Involutionsprozessen völlig zu verschwinden.

Das Neuroblastom ist ein solider Tumor weicher Konsistenz mit einer graurötlichen Schnittfläche. Zum Teil kann man Regressionsveränderungen in Form von Nekrosen, Einblutungen oder Verkalkungsherden beobachten. Das Tumorgewebe ist von unregelmäßigen Bindegewebssepten durchzogen und besteht aus kleinen, nacktkernigen Zellelementen mit monotonen hyperchromatischen Kernen (Riede UN, Saeger W 1995). Die meisten Tumoren bestehen aus primitiven, nicht ausdifferenzierten Neuroblastomzellen. In einigen Tumoren (etwa ein Dritte der Fälle) findet man große Zellen mit viel Zytoplasma, Zellfortsätze und Ausbildung von Rosetten, mit zentral fibrillär angeordnetem Material, bis hin zur ausdifferenzierten Ganglionzelle. Das Neuroblastom besitzt ein hohes Potential zum infiltrativen Wachstum. Dabei kommt es nicht selten zur Abschwemmung von Neuroblastomzellen in den Lymphbahnen und zum Transport derselben in die lokalen Lymphknoten. Die hämatogene Metastasierung ermöglicht vor allem Tochtergeschwulste in der Leber, der Haut und dem Skelett.

Das Staging-System für Neuroblastome teilt diese Tumoren in vier Untergruppen ein:

- Stage I: Der Tumor beschränkt sich auf sein Ursprungsorgan
- Stage II: Der Tumor breitet sich per continuitatem invasiv aus, überschreitet aber nicht die Körpermittellinie
- Stage III: Der Tumor hat sich über die Körpermittellinie ausgebreitet, und beidseitig sind lokale Lymphknoten in das maligne Geschehen involviert
- Stage IV: Der Tumor hat Metastasen in andere Regionen des Körpers gesetzt

Eine Sonderform stellt das Stadium IVS des Säuglings dar, zu dessen Eigenschaften wie oben beschrieben die spontane Remission zählt.

Neuroblastome könne überall dort auftreten, wo neuroektodermale Zellen an der Entwicklung beteiligt sind, und hier vor allem in der Nebenniere (25%) und in den abdominalen sympathikuszugehörigen Ganglien (50%) der vegetativen Nervensystems, ferner im Thoraxraum (10-15%). Daher differiert das klinische Erscheinungsbild mit dem Ort der Manifestation erheblich. Da die häufigste Lokalisation das Abdomen ist, findet sich als Primärbefund häufig eine tastbare, unregelmäßige Schwellung im Abdominalraum. Mit zunehmender Größe tendieren diese Tumorarten zum Überschreiten der Körpermittellinie. Mit Lebermetastasen kommt es zu einer Leberschwellung, und infolge von Einblutungen in den Tumor kann das Krankheitsbild mit anämischen Zuständen auftreten.

Das Neuroblastom wird bei pädiatrischen Patienten durch Operation und Chemotherapie behandelt. Die Hochdosischemotherapie bei Stadium IV-Patienten oder bei solch mit n-myc-Amplifikation im Tumor kann nach Durchführung der Stammzellsammlungen nach einem N5- oder N6-Block und anschließender Zweit-OP erfolgen (Caron A, Pearson A, 1998).

1.4.1.2 Weitere ausgewählte Tumoren des Kindesalters

Osteosarkom (ICD-10: C41.9)

Es handelt sich um einen hochmalignen Knochentumor aus pluripotenten osteoblastenartigen Zellen, der zur Bildung von Osteoid und einfachen Faserknorpelgewebe fähig ist. Jungen sind häufiger als Mädchen von der Krankheit betroffen (m:w=3:2).

Zu unterscheiden sind zwei unterschiedlich wachsende Arten dieses Tumors, nämlich die osteoplastischen und die osteoklastischen Tumoren. Erstere bilden eine neue, röntgendichte Knochenmatrix bei Knochenanbau, letztere verursachen eher einen blutig durchtränkten Zellbrei und zeigen sich auf dem Röntgenbild als Mottenfraß des Knochens. Am häufigsten ist die osteolytisch-sklerosierende Variante, die sich subkortikal entwickelt und durch reaktive Veränderungen des Knochens durch Einfluß des Tumors bestimmt wird. Als Sonderformen des Tumors könne die multizentrischen Osteosarkome, die teleangiektatischen Osteosarkome, die parostalen Osteosarkome, die Kiefer-Osteosarkome, die Pagets Osteosarkome und sie Strahlenosteosarkome aufgeführt werden.

Die Klinik bringt ein schnelles, destruierendes schmerzhaftes Tumorwachstum mit sich, eine frühzeitige hämatogene Metastasierung erfolgt häufig in die Lunge.

Mit intensiver Therapie nach jeweils aktueller COSS (Kombination aus Chemotherapie und chirurgischem Eingriff) ist die Prognose teilweise noch immer schlecht.

Ewing-Sarkom (ICD-10: C41.9)

Das Ewing-Sarkom ist ein rundzelliger primärer Knochentumor, dessen Zellen PAS-positives, zytoplasmatisches Glykogen enthalten und der keine Fasern bildet. Als typischer Tumor des Kindesalters sind Mädchen häufiger als Jungen davon betroffen (m:w = 1:2). Das Ewing-Sarkom ist in erster Linie ein osteolytischer Tumor, der das intakte Knochengewebe zerstört und die Osteoblasten verdrängt. Die Osteoklasten hingegen behalten ihre osteolytische Aktivität. Reaktiv zeigen sich Osteosklerosen, was zum typischen Mottenfraß-Bild in der Röntgenaufnahme führen kann. In den Diaphysen der langen Röhrenknochen lokalisiert, breitet sich das Ewing-Sarkom im Markraum, später auch entlang der Havers-Kanäle aus.

Der makroskopische Aspekt des Tumors ist von Blutungen und Nekrosen auf grauem Grund bestimmt.

Klinisch imponiert der Tumor durch Schwellung, Überwärmung, Schmerzen und Fieber, was zu Verwechslungen mit Osteomyelitiden führen kann. Die Metastasierung vom Cava-Typ betrifft meist Leber, Lunge und andere Knochen.

PNET (ICD-10: C71.9)

Die PNET stellen die Zusammenfassung einer ganzen Gruppe von undifferenzierten neuroepithelialen Tumoren dar. Dabei enthalten sie pluripotente Stammzellen des zentralen Nervensystems und werden entsprechend ihrer Manifestation und Lokalisation in Medulloblastome und zerebrale sowie spinale PNET unterschieden. Bei letzteren beiden handelt es sich um Tumoren, die sich bio- und morphologisch nicht von den Medulloblastomen unterscheiden lassen, jedoch außerhalb des Kleinhirns lokalisiert sind. Es besteht histogenetisch und histologisch eine enge Verwandtschaft zum Ewing-Sarkom.

Medulloblastome wachsen typischerweise in den IV. Ventrikel hinein, wobei sie in Folge der Verlegung der Liquorabflußwege einen Hydrozephalus provozieren können. Der extrem zellreiche Tumor weist eine markige, einheitliche Schnittfläche auf. Histologisch fallen die typischen neuroblastischen Rosetten auf.

Rhabdomyosarkom (ICD-10: C49.9)

Das Rhabdomyosarkom ist ein Weichteiltumor mit zwei Inzidenzaltersgipfeln um das vierte und um das 17. Lebensjahr, wobei männliche Individuen ein wenig häufiger betroffen sind (m:w = 1,4 : 1). Es ist dabei der häufigste Weichteiltumor des Kindesalters. Die Genese des Rhabdomyosarkoms kann auf primitive, noch pluripotente Stammzellen in der Embryonalentwicklung zurückgeführt werden, wobei der Tumor überall dort auftreten kann, wo embryonal Muskel- und Weichteilentwicklung stattfindet. Das Rhabdomyosarkom kann histologisch in Subtypen eingeteilt werden, wobei 60% dem embryonalen Typ zugerechnet werden; weiterhin existieren botryoide, alveoläre (ungünstigste Prognose) und pleomorphe Rhabdomyosarkome. Eine Assoziation mit dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom, dem Li-Fraumeni-Syndrom und dem familiären Retinoblastom ist bekannt. Rhabdomyosarkome kommen bevorzugt im Kopf- und Halsbereich sowie in der

Urogenitalregion vor. Der Tumor ist weich, unscharf begrenzt und weist eine graurötliche Schnittfläche auf.

Der Tumor metastasiert nach dem Cava-Typ hämatogen, Lymphknotenmetastasen sind seltener. Die Therapie basiert auf dem möglichst radikalen chirurgischen Eingriff und Chemotherapie, teilweise erfolgt Bestrahlung.

Non-Hodgkin-Lymphome (NHL, ICD-10:C85.9)

Das NHL ist ein primär lokalisierter Tumor des Lymphgewebes. Mit einem Verhältnis von 1:3 sind Mädchen seltener betroffen als Jungen, vor dem 3. Lebensjahr ist der Tumor sehr selten. Ca. 7% aller malignen Erkrankungen im Kindesalter sind NHL. Die klinische Manifestationen eines NHL sind v.a. Lymphknotenschwellungen und hepatosplenomegalie, rezidivierendes oder persistierendes Fieber, gastrointestinale Beschwerden, auch Husten, Stridor, Venenstauung, Zeichen von Liquordruckerhöhung und neurologische Ausfallerscheinungen. Die Diagnostik bezieh neben Anamnese und Untersuchung v.a. das Blutbild, die Knochenmarksuntersuchung, die Liquordiagnostik und die bildgebenden Verfahren wie Sonographie, Röntgenaufnahmen, MRT des Schädels und evt. die CT. Eine Klassifizierung der Erkrankung wird dann v.a. aufgrund der Histopathologie sowie der Zytogenetik getätigt. Dabei wird das Lymphom der B- oder T-Zellreihe zugeordnet, sowie ein Grading in hoch- bzw. niedrigmaligne Lymphome durchgeführt. Gängig sind die Klassifikationen nach der Kiel- oder REAL-Klassifikation. Die Therapie erfolgt differenziert nach den unterschiedlichen Entitäten des Tumors.

1.4.2 Therapieverfahren

Den einzelnen Tumoren im Kindesalter stehen verschiedene Therapieverfahren gegenüber, die in der Bundesrepublik Deutschland nur an speziell dafür qualifizierten Zentren im Rahmen von Therapieoptimierungsstudien und Therapieprotokollen durchgeführt werden sollten. Diese Therapien werden nur in den seltensten Fällen solitär angewendet, vielmehr haben sich bei malignen Erkrankungen Kombinationen aus den unterschiedlichen Therapiekonzepten bewährt.

Tumor	Therapiestudie der GPOH	Leitung
Neuroblastom	NB97	Universitätsklinik Köln
Osteosarkom	COSS 96	Universitätsklinik Münster
Ewing Sarkom	E.W.I.N.G. -99	Universitätsklinik Münster
Rhabdomyosarkom	CWS-96	Kinderklinik Stuttgart
PNET	E.W.I.N.G. -99	Universitätsklinik Münster
Non-Hodgkin-Lymphom	NHL-BFM 95	Universitätsklinik Gießen

Tab. 1.3 Die Tumoren der hier betrachteten pädiatrischen Patienten mit Zuordnung zu den gültigen Therapiestudienprotokollen und dem Sitz der jeweiligen Studienleitung

1.4.2.1 Die Hochdosis-Chemotherapie und Stammzelltransplantation

Die Hochdosischemotherapie in Verbindung mit der Transplantation hämatopoetischer Stammzellen darf heute als standardisiertes und evaluiertes

Verfahren der onkologischen Therapie bezeichnet werden. Grundlage für die Hochdosis-Chemotherapie ist die Vorstellung einer Beziehung zwischen verabreichter Dosis eines Chemotherapeutikums und dem Ausmaß der Tumorzellzerstörung. Die Kombination mit einer Stammzelltransplantation ermöglicht ein aggressives Vorgehen gegen den Tumor und eine anschließende Substitutions- und Support-Therapie des Patienten (Bokenmeyer C, Kranz L 1997). Die myeloablative, an sich letale Hochdosis-Chemotherapie kann durch eine Stammzelltransplantation im Anschluss an die erwünschte Vernichtung der Tumorzellen durch eine schnelle Regeneration des zerstörten Knochenmarks in ihren Nebenwirkungen für den Patienten abgemildert, bzw. überhaupt erst verträglich gemacht werden.

Die Knochenmarktransplantation, ursprünglich die einzige Möglichkeit zur Verpflanzung von hämatopoetischen Stammzellen, ist noch immer eine alternative Therapieoption zur peripheren Stammzelltransplantation. Bei der Knochenmarktransplantation werden durch Punktion in Vollnarkose Knochenmarkszellen aus dem Mark gewonnen, wobei etwa 20 ml/kg Körpergewicht an Knochenmark bzw. $5 \cdot 10^8$ Zellen /kg Körpergewicht gewonnen werden müssen. Da die Transplantation von Blutstammzellen durch eine Stammzellsammlung aus dem peripheren Blut wesentlich einfachere und ungefährlichere Transplantatentnahmetechniken darstellen, und zudem noch bessere klinische Ergebnisse für die hämatologische Regeneration durch eine Stammzelltransplantation erreicht werden können, zieht man diese der Knochenmarktransplantation vor (Schmitz N et al 1996, Hartmann et al 1997).

Die Indikation zur Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation wird nach der jeweiligen Grundkrankheit gestellt, und ist in Form von Therapiestudien, teilweise über eine Randomisierung, in die Therapie von onkologischen Erkrankungen im Kindesalter integriert. Typische Therapieindikation sind in Tabelle 1.3 zusammengestellt (Stachel D 1999).

Angeborene Erkrankungen	Nicht-Maligne erworbene Erkrankungen	Maligne Erkrankungen
Immundefekte (z.B. SCID, Wiskott-Aldrich-S. Chron. Granulomatose)	Aplastische Anämie Multiple Sklerose	Akute lymphatische Leukämie Akute myeloische Leukämie
Hämatogenese-Defekte (z.B. Fanconi Anämie, β -Thalassämie)	Systemischer Lupus erythematodes Schwere chronische juvenile Arthritis	Chronische Myeloische Leukämie Non-Hodgkin-Lymphome
Osteopetrose		Hodgkin-Lymphome
Stoffwechseldefekte (Mukopolidose, Adrenoleuodystrophie, Lesh- Nyhan-Syndrom)		Myeloplastisches Syndrom
		Solide Tumoren

Tab. 1.3 Indikationen für Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantationen

Im Gegensatz zur allogenen und syngenen Stammzelltransplantation mit Gewinnung der Stammzellen von gesunden Spendern, muss bei der autologen Stammzelltransplantation das Transplantat noch vor der eigentlichen Therapie vom Patienten entnommen werden. Während sich die autologe Stammzelltransplantation vor allem bei soliden Tumoren und solchen Krankheiten bewährt hat, bei denen das Knochenmark nicht direkt in den Krankheitsprozess einbezogen ist, bieten sich folglich bei Leukämien, Anämien und myelodysplastischen Syndromen die allogenen Stammzellquellen an.

Die Transplantatentnahme von hämatopoetischen Stammzellen aus dem peripheren Blut, erfolgt über die maschinelle Apherese von Leukozyten aus dem peripheren Blut. Da sich CD34+ Stammzellen normalerweise nur in sehr geringen Mengen im Blut finden, ist eine Stimulation und Mobilisierung der Stammzellen im Vorfeld erforderlich. Jene erfolgt mit G-CSF oder GM-CSF im Anschluss an einen Chemotherapie-Block. Dabei wird, nach geprüften Voraussetzungen, Aufklärung und einer Vorbereitungsphase, eine apheresierte Stammzellmenge möglichst mehr als $2 \cdot 10^6$ CD 34+ Zellen/kg Körpergewicht des Patienten angestrebt, um ein ausreichend großes Transplantat für die spätere Therapie zu gewinnen. Dabei werden für pädiatrische Patienten zum Teil wesentlich höhere Mengen an CD34+ Stammzellen gefordert (Madero L 1998). Es ist davon auszugehen, dass eine höhere Anzahl transplantierte CD34+ Zellen auch ein besseres Ergebnis der Transplantation sowie des Angehens der verschiedenen Zelllinien erwarten lässt (Glaspy J, 1997).

Unter klinischer Überwachung wird der Patient nachversorgt, während das Transplantat aufbereitet, durch Kryokonservierung haltbargemacht und für die spätere Transplantation bereitgehalten wird. Dabei hat sich in besonderem Maße die Isolierung und Konzentrierung der CD34+ Stammzellen durch Zellsortierung mit Hilfe von magnetischen Antikörpern und einem Durchflussmagneten als besonders erfolgversprechend erweisen (Kato K, Radbruch A, 1993). Je nach Art und Protokoll gehören zur Transplantataufbereitung weiterhin Konzentrierung, Depletierung von T-Zellen und die Reinigung des Transplantats von Tumorzellen. Im Anschluss an die erfolgreiche Apherese und Aufbereitung kann eine Hochdosischemotherapie unter strengsten Hygienebedingungen zur Vermeidung von Infektionen durchgeführt werden. Alle Hochdosischemotherapien werden nach entsprechenden Therapieprotokollen durchgeführt. Als Nebenwirkungen dieser Therapie sollen hier nur die wichtigsten wie Schleimhautschäden, Nephro- und Hepatotoxizität, Neuropathien, Leukoenzephalopathie, Pneumonien und Enzephalitiden genannt werden.

Nach Abschluß der Therapie kann das Transplantat schließlich durch einen zentralvenösen Zugang infundiert werden, welches so eine Regeneration der Knochenmarksfunktion ermöglicht. Dabei ist bemerkenswert, dass das Angehen des Transplantates in hohem Grade mit der infundierten Zellzahl an CD34+ Zellen korreliert (Diaz MA et al 1996), was die Bedeutung einer guten Ausbeute bei der Sammlung der Stammzellen nochmals bestätigt. Der Einfluss der CD34+ Zellen auf das Angehen des Knochenmarks kann, als wichtigster Parameter für den Transplantationserfolg bei Kindern, gar nicht überschätzt werden (Diaz MA et al 1998).

Nach der Transfusion unterliegt der Patient für eine Zeit von zwei bis drei Wochen einem hohen Infektionsrisiko, ehe zum sogenannten "Take" die Leukozytenzahlen langsam ansteigen und die Immunabwehr sich erneut aufbaut. Für die allogene transplantierten Patienten stellt sich nun noch die Gefahr einer Abstoßungsreaktion vor allem in Form der Graft-versus-host-Reaktion, der mit einer immunsuppressiven Therapie entgegen gewirkt werden muss. Die Prognose der Grunderkrankung bei der Hochdosistherapie mit Stammzellen ist von mehreren Faktoren abhängig, vor allem vom Erkrankungsstadium, der Vortherapie, der Qualität und Quantität des Stammzelltransplantats. Der mittelfristige Erfolg der Stammzelltransplantation, etwa über einen Zeitraum von 10 Jahren hinweg, scheint heute als weitgehend gesichert. Für eine Gruppe von vierundzwanzig pädiatrischen Hochrisikopatienten mit unterschiedlichsten Tumoren wird eine Rate für 2-Jahre krankheitsfreies Überleben nach Hochdosischemotherapie und Transplantation von 39% aufgezeigt, eine 4-Jahres-Rate von 35%. Dabei scheinen Patienten in Teilremission einem weit höheren Risiko für ein erneutes Auftreten der Krankheit nach Transplantation zu haben, als Patienten in Totalremission (Perentesis J et al 1999). Es wird sogar von autologen Transplantationen mit einer Lagerzeit des Transplantats von mehr als 13 Jahren berichtet (Schuld A et al 1999). Ob ein solch neu angelegter Hämatopoeseapparat den Patienten ein ganzes Leben lang dienen wird, kann heute noch nicht mit Sicherheit gesagt werden.

1.4.2.2 Weitere Therapieverfahren

Chemo-Therapie

Spezifisch für die Art der Tumorerkrankung und nach einheitlichen Therapieprotokollen können entsprechend sensible Tumoren mit Substanzen bekämpft werden, die entweder direkt in den Zellzyklus eingreifen oder indirekt im Sinne einer Hormonwirkung das Zellwachstum hemmen. Zu diesen Substanzen gehören die Gruppen der Alkylantien, der Antimetabolite, einige Naturstoffe wie Antibiotika, Pflanzenalkaloide, Taxane, DNA-Topoisomeraseinhibitoren, Enzyme, Interferone, aber auch Hormone, Hormonantagonisten und Platinverbindungen. Zu unterscheiden sind, im Sinne unterschiedlicher Therapiegrundkonzepte, die adjuvante, die neoadjuvante, die kurative und palliative Chemotherapie.

Operative Verfahren (Largiadèr F, Metzger U, 1999)

Neben den zahlreichen Eingriffen zum Ermöglichen einer Diagnose durch den Pathologen (Feinnadelpunktion, Lavage, endoskopische Biopsie, direkte operative Messerbiopsie) ist die chirurgische Entfernung solider maligner Tumoren eine der wichtigsten und ältesten Behandlungsstrategien. Zudem gilt noch immer, daß der kurative chirurgische Eingriff bei den meisten Tumoren die besten Voraussetzungen für eine Heilung bietet.

Angestrebt wird in jedem Fall eine totale Resektion des entarteten Gewebes ohne Zurückbleiben von Tumormaterial. Eine solche Exzision des Tumors im Gesunden, einschließlich der regionalen Lymphknoten als potentielle Metastasenherde, wird generell als radikale Operation (R0) bezeichnet. Bei einer nicht-radikalen Operation verbleibt Tumorgewebe im Patienten, entweder mikroskopisch (R1) oder sogar makroskopisch (R2).

Zudem ist zwischen kurativer und palliativer chirurgischer Intervention zu unterscheiden, deren Indikation sich v.a. aus der klinischen Tumorstadieneinteilung (in der Regel nach dem TNM-System) und dem aktuellen Behandlungsziel ergibt.

In vielen Fällen kann ein chirurgischer Teilerfolg, eine Tumorreduktion durch eine Chemotherapie und/oder eine Strahlentherapie ergänzt werden.

Das Risiko einer chirurgischen Intervention liegt vor allem in Narkoseunverträglichkeiten, Kreislauf-Komplikationen unter der Operation in Funktionsverlusten, Infektionen und der Gefahr schwerer Blutungen begründet.

Strahlentherapie

Bei einigen Tumoren hat es sich etabliert, gegen entsprechend sensible Tumorzellen solider Tumoren ionisierende Strahlen einzusetzen, um die Tumormasse zu verringern. Durch die geplante Bestrahlung eines klar definierten, gegen andere Körperregion durch strahlenundurchlässiges Material ausgeblendeten Körperareals können Tumorzellen vernichtet bzw. in die Apoptose gebracht werden. Strategien wie die Aufteilung der Gesamtstrahlendosis auf viele einzelne Sitzungen, die Bündelung einzelner, unter unterschiedlichen Winkeln zusammentreffender, niedrig dosierter Strahlenbündel im Tumorgewebe selbst und die gezielte Verwendung unterschiedlicher Strahlen bieten eine ganze Reihe von Kombinationsmöglichkeiten. Die Strahlentherapie ist somit eine in der Regel nicht-invasive Therapiemöglichkeit, birgt aber auch Gefahren für das gesunde Gewebe des Kindes.

Immuntherapie

Das Immunsystem des Menschen weist selbst einige Mechanismen zur Tumorbekämpfung auf, deren Wirksamkeit vor allem bei den viral induzierten Tumoren nachgewiesen ist, von deren Versagen aber ausgegangen werden kann, wenn sich ein Tumor manifestiert. Daher bedarf es immunmodifizierender und immunsupportiver Maßnahmen, um Tumoren mit Hilfe der Immunabwehr zu bekämpfen. Der Angriffspunkt der verschiedenen Therapien sind von den Tumorzellen exprimierte Peptide, das Werkzeug der Immuntherapie sind immunkompetente Zellen, meist T-Zellen. Tumorzellen können auf ihrer Oberfläche individualspezifische, aber auch tumorspezifische Antigene präsentieren, die von T-Zellen erkannt werden können. Diese Antigene können Produkte der Reproduktion eines den Tumor induzierenden Virus sein, ebenso wie typische Tumorstoffwechselprodukte wie zum Beispiel Peptide oder Oberflächenantigene. Solche mehr oder weniger tumorspezifischen Antigene sind möglicher Angriffspunkt einer Immuntherapie: einerseits können dem Immunsystem spezifische monoklonale Antikörper gegen diese Antigene von außen zur Verfügung gestellt werden, zum anderen ist eine Präsentation dieser Antigene mit dem Ziel der T-Zellaktivierung möglich (Gramatzki M, Valerius T 1997).

Um eine T-Zell-Antwort des Immunsystems zu provozieren, ist die Präsentation dieser Antigene auf antigenpräsentierenden Zellen notwendig, sowie die Interaktion der T-Zelle mit zwei Rezeptoren: der Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit dem MHC-Peptid-Komplex einer antigenpräsentierenden Zelle, und die Interaktion der T-Zelle mit einem akzessorischen Molekül (z.B. einem CD80 oder CD86-Antigen). Interagiert eine T-Zelle nur mit dem MHC-Peptid-Komplex, leitet sie die Apoptose ein oder wird anerg. Dies kann als weiterer Therapieansatz genutzt werden, indem genmodifizierte

Tumorzellen, die CD80 oder CD86 exprimieren, als Aktivator für T-Zellen eingesetzt werde, und die T-Zellen somit auch gegen die nicht-manipulierten Tumorzellen vorgehen können. Noch weiter vorne in der Kaskade der Immunantwort ansetzend, manipuliert man heute antigenpräsentierende Zellen, vornehmlich dendritische Zellen, um eine Immunantwort gegen Tumorzellen zu provozieren. Diese Zellen können in-vitro mit DNA, RNA, Peptiden und Tumorlysat beladen werden, um anschließend autolog im Immunsystem des Patienten die T-Zell-Stimulation anzutreiben. Weitere, weniger spezifische Immuntherapien werden mit Zytokinen wie Interferon α , Interferon γ oder Interleukon-2 durchgeführt (Pezzutto A 1998).

1.5 Die Mobilisierung CD34 positiver Stammzellen bei pädiatrischen Patienten

1.5.1 Mobilisierung der CD34+ Zellen im Vorfeld der autologen Stammzelltransplantation

Wie bereits erwähnt, sind etwa 1-4% der kernhaltigen Zellen im Knochenmark CD34-positiv. Im peripheren Blut hingegen sind es nur 0,01-0,04% der zirkulierenden Zellen (Schwella N, Huhn D 1998). Damit wird die Schwierigkeit deutlich, die sich ergibt, wenn man im "steady-state" ein autologes Transplantat (gleiches gilt auch für allogene Transplantationen) gewinnen möchte: mit Hilfe der bekannten Techniken wäre es nicht möglich, die bereits erwähnten $2 \cdot 10^6$ Zellen pro kg Körpergewicht für ein Transplantat zu sammeln. Daher hängt der Erfolg einer Stammzelltransplantation bzw. der entsprechenden Transplantatgewinnung ganz entscheidend von der Mobilisierung der Stammzellen aus dem Knochenmark ab. Verschiedene Methoden zur Mobilisierung der Stammzellen sind heute bekannt.

1.5.1.1 Therapeutische Einflussnahme auf die Stammzellmobilisierung

Zeitlich noch vor einer gezielten Einflussnahme durch Wachstumsfaktoren gelegen, hat die Chemotherapie, die einer Mobilisierungsphase mit G-CSF bei pädiatrischen Patienten mit malignen Erkrankungen vorausgeht, einen großen Einfluss auf die spätere CD34+ Stammzellmobilisierung. Für eine einzelne Dosis Cyclophosphamid ist der Effekt einer Steigerung der Stammzellausschüttung aus dem Knochenmark in das periphere Blut bereits seit langem bekannt (To LB 1990). In mehreren Untersuchungen an Erwachsenen und Kindern konnten gezeigt werden, dass eine der Stimulation vorausgegangene Chemotherapie und deren Intensität in Bezug auf die Toxizität der verwendeten Substanzen einen positiven Einfluss auf die Mobilisierung von Stammzellen unter dem Einfluß von G-CSF aufweist (Kasparu H et al 1996, Knudsen et al 1996).

Dieser auch als „cytotoxic mobilization“ bezeichneten Form der Stammzellmobilisierung steht die sogenannte „steady-state“-Mobilisierung mit Wachstumsfaktoren gegenüber. Auch die Wirkung von Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) bei pädiatrischen Patienten mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen ist gut belegt. Unter Verwendung von G-CSF zur Mobilisierung CD34+ Stammzellen können hohe Konzentrationen an CD34+ Stammzellen im

peripheren Blut erreicht werden, sowie hohe absolute Stammzellzahlen im Apherisat und Transplantat (Bensinger et al 1995, Weaver et al 1995).

Dosen von 10 µg/kg Körpergewicht pro Tag können eine Konzentrationssteigerung der CD34+ Zellen im peripheren Blut von Kindern um ein Vielfaches bewirken. Bereits nach vier bis fünf Dosen G-CSF werden Maximalwerte der CD34+ Zellkonzentration erreicht (Kanold J et al. 1998). Auch von erwachsenen Patienten werden schon seit längerem gute Ergebnisse bei der alleinigen Stimulation mit G-CSF berichtet (Duhrsen U et al 1988). Neben G-CSF wurde weiterhin GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) zur Stimulation und Mobilisierung der Stammzellen zur Verfügung. Die Stimulation CD34+ Stammzellen mit Hilfe des GM-CSF erweist sich in Bezug auf die CD34+ Zellkonzentration im peripheren Blut der Patienten jedoch nicht als vorteilhaft, verglichen mit einer Stimulation mit G-CSF (Fischmeister G et al 1999). Eine bessere Stimulation mit G-CSF zeigt sich auch bei pädiatrisch-onkologischen Patienten mit Neutropenien, bei denen G-CSF dem GM-CSF in seiner Stammzell-mobilisierenden Wirkung überlegen ist (Lydaki E et al 1995). Auch Stem Cell Factor (SCF) hat grundsätzlich das Potential, CD34+ Stammzellen in vitro v.a. in Kombination mit Interleukin-3, GM-CSF oder G-CSF zu gesteigerter Kolonienbildung (CFU-GM) anzuregen (Berstein ID, Andrews RG, Zsebo KM 1991). Die Kombination von G-CSF mit SCF scheint einen weiteren Vorteil für die Mobilisierung der Stammzellen zu bieten; so konnte für Patientinnen mit Brustkrebs nachgewiesen werden, dass die Kombinationsstimulation der CD34+ Zellen mit G-CSF und SCF bei dieser Patientengruppe der Singulärstimulation mit G-CSF überlegen ist (Glaspy JA et al 1997).

Neben diesen eben beschriebenen Einflüssen beim einfachen Einsatz von Chemotherapie oder Wachstumsfaktoren, hat sich eine Kombination von G-CSF und zytotoxischen Substanzen im Rahmen der einer Mobilisierung als effektive Vorbereitung für eine Transplantatgewinnung erwiesen (Demeocq et al 1994). Zum einen ist die Dauer der Stimulation bis zum maximalen Stimulationseffekt im Sinne eines Maximums der CD34+ Zellen im peripheren Blut bei Kombinationsstimulation verkürzt. Zum anderen kann so auch eine signifikant höhere CD34+ Zellkonzentration, als bei alleiniger Chemotherapie erreicht werden. Bei einer Mobilisierung von erwachsenen Patienten vor einer autologen Stammzelltransplantation mit 10 µg/kg KG pro Tag bei einer Kombination von G-CSF und Chemotherapie (5g/m² Cyclophosphamid), und einer Vergleichsgruppe mit alleiniger G-CSF-Stimulation, erreichte die Gruppe mit Chemotherapie eine signifikant höhere Ausbeute an CD34+ Zellen. Die Anzahl der benötigten Apheresesitzungen, das apherisierte Blutvolumen und die Dauer der Neutropenie nach Transplantation wurden durch die Chemotherapie in Bezug auf die Vergleichsgruppe nicht signifikant beeinflusst (Narayanasami U et al., 2001). Diese verbesserte Wirkung der Chemotherapie in Kombination mit G-CSF wurde auch bei erwachsenen Patienten nach der myoablativen Hochdosischemotherapie beschrieben (Teofili L et al. 1994). Für Erwachsene mit multiplen Myelomen kann zudem eine positive Dosis-Wirkungsbeziehung für das Cyclophosphamid dargestellt werden, wobei gezeigt werden kann, dass die Gabe von 7 g/m² Cyclophosphamid zur Stimulation der Gabe von 4 g/m² (jeweils in Kombination mit G-CSF) überlegen ist (Goldschmidt H et al 1996). Des Weiteren liegen Nachweise für eine besonders hohe Konzentration an

CD34+ Zellen im peripheren Blut nach Kombinationstherapie im Vergleich zu einfacher G-CSF-Stimulation, einfacher Chemotherapiestimulation, unstimuliertem Knochenmark und Nabelschnurgewebe vor (Van Epps DE et al, 1994).

Neben diesen genannten Einflüssen auf die Mobilisierung von Stammzellen im peripheren Blut ist noch ein weiterer, iatrogen ausgelöster Effekt zu nennen, nämlich der Anstieg der Stammzellkonzentration nach einer durchgeführten Leukapherese. Nachdem es eine Reihe von Hinweisen darauf gegeben hat, dass ein solcher Effekt während einer Leukapherese auftritt (Kiefer T et al 1997), spricht heute vieles dafür, dass es zumindest bei erwachsenen Patienten und unter den Bedingungen einer LVL (Large Volume Leukapheresis; Leukapherese von mindestens des dreifachen Körperblutvolumens des Patienten) zu einer nachweisbaren Rekrutierung von CD34+ Zellen in das periphere Blut kommt (Smolowicz AG et al 1999). Diese Mobilisierung von CD34+ Zellen lässt sich sogar quantifizieren, indem zunächst eine Messung der CD34+ Zellen im peripheren Blut vorgenommen wird, und anschließend das Pherisat bei jeder Apherese fraktioniert, z.B. in drei Fraktionen, gesammelt wird. Auf diese Weise lässt sich eine Steigerung der CD34+ Zellmenge im Phereseprodukt gegenüber dem peripheren Blut des Patienten vor der Apherese nachweisen, die um den Faktor 1,4 höher liegt (Cull G et al 1997).

1.5.1.2 Individualfaktoren

Für erwachsene Patienten mit malignen Lymphomen ist bereits aufgezeigt worden, dass iatrogene Manipulationen, namentlich die Behandlung im Rahmen einer Radio- oder Chemotherapie, einen signifikanten Unterschied für das Ergebnis der Stammzellsammlung bewirken können.

Das Alter des Patienten kann ebenso eine Rolle spielen, vor allem ab der vierten Lebensdekade: Anderlini et al. (1997) konnten nachweisen, dass ein Lebensalter von mehr als 55 Jahren negativ mit dem Erfolg der Apherese bei gesunden Probanden korreliert, weitere Ergebnisse mit einem Kollektiv von 103 gesunden Spendern sahen diese Altersgrenze bei 38 Jahren, so dass ab einem Spenderalter von ca. 40 Jahren mit einem geringeren Erfolg der Apherese zu rechnen ist (de la Rubia J et al 2002). Obwohl es also Hinweise dafür gibt, dass sich ein hohes Lebensalter zum Zeitpunkt der Stimulation grundsätzlich negativ auf die Mobilisierbarkeit der CD34+ Stammzellen auswirkt, scheint sich dies zumindest in den ersten Lebensdekaden nicht signifikant auszuwirken (Bensinger W et al 1995).

Demgegenüber scheinen Geschlecht, Krankheitsstatus und die Zeitspanne zur letzten Chemotherapie keine signifikanten Auswirkungen hervorzubringen (Haas R et al 1994). Die Anzahl der vorausgegangenen Chemotherapieblöcke ist jedoch negativ mit dem Stimulationserfolg korreliert (Madero L et al. 1998). Auch eine Vorbestrahlung im Rahmen der Therapie wirkt sich zumindest in Einzelfällen negativ auf den Mobilisierungserfolg der Stammzellen aus, wenngleich bei einem Gros der Patienten keine Korrelation zwischen Bestrahlung und Aphereseerfolg festgestellt werden kann (Canales MA et al. 2001). Grundsätzliche Voraussagen bezüglich einer schlechten Mobilisierbarkeit von CD34+ Stammzellen sind jedoch, zumindest beim

erwachsenen gesunden Individuum, trotz einer Signifikanz für schlechte Stimulierbarkeit mit steigendem Alter, nicht möglich (Anderlini P et al 1997).

Mehrfach wurde gezeigt, dass die Unterschiede der Mobilisierung von Stammzellen bei Kindern und Erwachsenen nicht von klinischer Relevanz sind, sieht man von den grundsätzlichen Unterschieden zwischen Pädiatrie und Erwachsenenmedizin sowie von Sonderfällen bei sehr jungen Kindern ab (Haas R et al 1994, Kawano Y et al 1998). Auch für pädiatrische Patienten wird mit ansteigendem Gewicht, steigendem Alter und steigender Zahl vorausgegangener Chemotherapieblöcke ein negativer Einfluss auf die Mobilisierung der CD34+ Zellen beschrieben. Dabei werden jedoch Kinder mit einem Körpergewicht unter 25 kg von den negativen Einflüssen der Chemotherapieblöcke ausgenommen. Des weiteren kann auch die Art der onkologischen Erkrankung einen Einfluß auf den Mobilisierungserfolg ausüben, da z.B. für pädiatrische Patienten mit Neuroblastomen eine schlechter Mobilisierung der CD34+ Zellen beschrieben wird (Madero L et al 1998).

Ein Versuch, die individuellen Faktoren, die schließlich eine erfolgreiche Apherese unterstützen oder in Frage stellen, bei den Patienten abschätzbar zu machen, ist das vom Institut Gustave Roussy Entwickelte Scoresystem, welches Patientenparametern Punkte zuordnet, um so eine Einschätzung der Voraussetzungen geben zu können. An 56 Patienten konnte das System erprobt werden, wobei 80% der Patienten mit einem Score von 0-15 Punkten eine erfolgreiche Apherese verzeichnen konnten, während es unter 20% bei den Patienten mit einem Score über 25 waren (Vantelon JM et al. 2000).

1.5.2 Optimierung der Stimulation und Mobilisierung von CD34+ Stammzellen im peripheren Blut

1.5.2.1 Den Erfolg der Apherese determinierende Parameter

Aufgrund der aufwendigen Verfahrensweisen, die mit einer Stammzellsammlung einhergehen, und in Hinblick auf die Therapieplanung und das individuell abgestimmte Transplantationsverfahren versucht man, das Ergebnis einer Leukapherese in Bezug auf die Ausbeute an CD34+ Stammzellen mit Hilfe anderer klinischer Parameter vorausszusagen. Eine wichtige Voraussetzung für weitere Überlegungen zur Mobilisierung CD34+ Stammzellen ist dementsprechend, dass eine hohe Korrelation zwischen der Anzahl der CD34+ Zellen im peripheren Blut des Patienten vor der Apherese der Leukozyten und der CD34+ Zellzahl bzw. der CFU-GM-Ausbeute im Aphereseprodukt (Kasparu H et al 1996, Knudsen et al 1996, Armitage S et al 1997) besteht. Auch die Geschwindigkeit der hämatologischen Rekonstitution korreliert stark mit der Menge an transplantierten Stammzellen, so dass von einer Dosis-Wirkungs-Beziehung gesprochen werden kann (Dias et al 1996a, Madero et al 1998). Andere Untersuchungen gehen sogar noch einen Schritt weiter und weisen eine semiquantitative Voraussagemöglichkeit der Ausbeute an CD34+ Stammzellen im Transplantat über eine CD34+ Bestimmung im peripheren Patientenblut auf. Für die Leukapherese großer Volumen (LVL) bei pädiatrischen Patienten kann festgestellt werden, dass eine Zellzählung der CD34+ Zellen im peripheren Blut der Kinder am Tag der Apherese eine hohe Korrelation mit der

Anzahl der gesammelten CD34+ Zellen im Pherisat aufweist (Dias MA et al 1999). Erwachsene Patienten zeigen auch unter Standardapherese-Prozeduren eine hohe Korrelation der CD34+ Zellkonzentration mit der CD34+ Zellzahl im Pherisat, so dass diese als ein guter Voraussageparameter für den Erfolg der Apherese gewertet werden kann (Fukuda M et al. 1998, Johnsen et al 1999, Yu et al. 1999). Eine noch bessere Korrelation zwischen der CD34+ Zell im peripher venösen Blut des Patienten vor der Apherese und der CD34+ Zellkonzentration im Pherisat lässt sich erreichen, wenn zur Stimulation anstatt der einfachen Verwendung von G-CSF eine Kombination aus Cyclophosphamid und G-CSF verwendet wird (Knudsen LM et al 1996). Insgesamt scheint also die Durchführung eines Stammzellmonitorings im Vorfeld einer Apherese vor Hochdosismethotherapie ein angemessener Schritt zur Prädiktion des Aphereseerfolges zu sein (Locatelli et al. 1998). Eine französische Muticenterstudie beschreibt zudem drei Parameter, die den Erfolg einer Stammzellsammlung voraussagen können, namentlich die CD34+ Zellkonzentration im peripheren Blut, die Anzahl der Apheresen und das apherisierte Blutvolumen. Da letztere Parameter im Ermessen der durchführenden Institution liegen, bleibt als vorgegebener Parameter die CD34+ Zellzahl (Clement A et al. 2000). Für pädiatrische Patienten ist eine Korrelation zwischen CD34+ Zellen im peripheren Blut und der späteren Aphereseausbeute mit einem Korrelationskoeffizienten von $p=0.91$ beschrieben worden, der damit über dem bei Erwachsenen von $p=0.88$ lag. Somit ist die Anzahl der CD34+ Zellen im peripheren Blut insbesondere pädiatrischer Patienten vor der Apherese das wichtigste Voraussagekriterium über den Erfolg der Stammzellsammlung.

Dem gegenüber eignen sich Zählungen der Leukozyten nicht zur Vorhersage des Aphereseerfolges (Urashima M et al 1994, Yu J et al 1999). Wenngleich eine Studie an 61 erwachsenen Patienten eine gewisse Aussagefähigkeit über den Erfolg der Apherese im Sinne einer hohen Korrelation von CFU im Pherisat mit der Konzentration an mononukleären Zellen im peripheren Blut sieht (Olivieri A et al. 1994), konnten mehrerer Folgestudien darstellen, dass eine solche Korrelation keinen weiteren Aussagewert für den Erfolg der Apherese hat (D'Arena et al 1998, Yu J et al 1999). Dementsprechend muß es erklärtes Ziel der klinischen Behandlung sein, den Anteil CD34+Zellen im peripheren Blut vor der Apherese zu maximieren. Diese Zielsetzung führt zu unterschiedlichen Ansätzen und Lösungsstrategien, die auf den verschiedenen, oben bereits eingeführten Einflussgrößen einer Stammzellmobilisierung lasten.

1.5.2.2 Optimierung der G-CSF-Dosis

Eine direkte Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der Menge an subcutan verabreichtem G-CSF und dem Stimulationserfolg besteht bei pädiatrischen Patienten nicht (Kurekci AE et al 1998). Zwar kann die CD34+ Zellkonzentration zu einem gewissen Grade durch eine Erhöhung der G-CSF-Dosis pro kg Körpergewicht gesteigert werden, und gerade im Bereich niedriger Dosierung ist für erwachsene Gesunde eine gewisse Abhängigkeit der Zellzahl von der Dosis abzuleiten (Dreger P et al 1994, Höglund et al 1996). Dieser Effekt beschränkt sich jedoch auf einen nicht beliebig erweiterbaren Dosierungsbereich und ist auch nicht für pädiatrische Patienten gesichert (Weaver CH et al 1998). Damit wird die Möglichkeit einer

Optimierung der Stammzellmobilisierung durch eine Dosisanpassung des G-CSF im Sinne einer Dosissteigerung stark eingeschränkt.

Im Gegensatz dazu haben Versuche mit niedrigdosiertem G-CSF ($50\mu\text{g}/\text{m}^2$ Körperoberfläche pro Tag) bei adulten Lymphompatienten gezeigt, dass eine CD34+ Ausbeute für das erste Pherisat schlechter war als für ein Vergleichsprodukt nach normal dosierter G-CSF-Stimulation ($5\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht pro Tag), dass jedoch für das gesamte Transplantat gleiche CD34+ Zellzahlen erreicht werden konnten (Martinez C et al 1997). Demgegenüber scheint, im Gegensatz zu einer einfachen Dosiserhöhung die Aufteilung (und evt. gleichzeitige Erhöhung) der G-CSF-Dosis auf zwei Gaben pro Tag einen positiven Effekt auf die CD34+ Zellmobilisation zu haben (Zeller et al 1996).

Eine signifikant höhere Ausbeute an CD34+ Stammzellen am ersten Apheresetag ist bei einer Gabe von $2 \times 5\mu\text{g}/\text{kgKG}/\text{d}$ gegenüber $1 \times 10\mu\text{g}/\text{kgKG}/\text{d}$ für eine kleine Gruppe von 17 pädiatrischer Patienten und Normalpersonen nachgewiesen worden (Lee et al 2000). Bei gesunden erwachsenen Spendern, die für eine allogene Transplantation spenden, kommt es unter einer zweizeitigen Stimulation von jeweils etwa der halben Tagesgesamtdosis zu einer signifikant höheren Ausschüttung von CD34+ Zellen im Vergleich zur einmalig täglichen Gabe der Gesamtdosis (Arbona C et al 1998). Ähnliche Ergebnisse gibt es auch bei Patientinnen mit Brustkrebs, bei denen eine Gabe von $2 \times 5\mu\text{g}/\text{kgKG}$ Filgrastim einer Einfachgabe von $10\mu\text{g}/\text{kgKG}$ Filgrastim bei der Stammzellmobilisierung überlegen ist; auf den Anstieg der Leukozyten und Thrombozyten kann dies jedoch nicht übertragen werden (Kröger N et al 1998).

1.5.2.3 Zeitliche Optimierung der Leukoapherese

Zur Wahl des richtigen Zeitpunktes der Leukoapherese ist zunächst festzustellen, daß hierbei zwei unterschiedliche Aspekte ins Auge zu fassen sind: zum einen ist ein richtiger Sammelzeitpunkt - bezogen auf die Tage nach dem Beginn der G-CSF-Gabe in Tagen - zu finden. Zum anderen zeigen sich tageszeitlich starke Schwankungen der CD34+ Konzentration, so dass auch nach einem optimalen Tageszeitpunkt der Apherese zu fahnden ist.

Für erwachsene Patienten ist bereits nachgewiesen worden, dass die Anzahl der Monozyten im peripheren Blut, welche ja mit einfachen Mitteln nachzuweisen sind, durch die Stagnation ihres Anstieges und Erreichen eines Konzentrationsplateaus den Gipfel der CD34+ Zellkonzentration ankündigt und somit als Marker für einen optimalen Sammelzeitpunkt dienen könnte (Hansson M et al 1995). Als wenig hilfreich hat sich die Zählung der Gesamtleukozyten im peripheren Blut erwiesen, da hier keine eindeutige Korrelation zwischen der Leukozytenkonzentration im peripheren Blut und der CD34+ Zellkonzentration im Blut bzw. im Transplantat nachgewiesen werden kann. Zwar scheint ein gleichzeitiger Anstieg der Leukozyten, Thrombozyten und der Retikulozyten auf einen Anstieg der CD34+ Zellen hinzuweisen, eine signifikante Korrelation lässt sich jedoch nicht finden (Urashima M et al 1994, Yu J et al 1999). Je nach verwendetem Wachstumsfaktor ist das Maximum der CD34+ Zellen vor oder nach dem Maximum der Leukozytenkonzentration (Weber 1993) meßbar.

Wie weiter oben beschrieben, hat die Konzentration CD 34+ Zellen im peripheren Blut des Patienten einen hohen Voraussagewert für die CD34+ Zellkonzentration im späteren Aphereseprodukt. Während eine Ausgangszellzahl von unter 20000 CD34+ Zellen/ml in bis zu 50% zu einem Versagen Stammzellsammlung für eine Apherese beim erwachsenen Patienten führen kann, kann die Erfolgsrate der Stimulation und damit der Apherese auf 80% gesteigert werden, wenn diese Grenze nicht unterschritten wird. Bei Patienten, die sehr gut auf die Mobilisierung ansprechen (High - Responder mit mehr als 80000 CD34+ Zellen / ml) reicht dann bereits meist eine einzige Apherese aus, während von anderen Patienten (Low-Responder mit unter 40000 CD34+ Zellen/ml) auch nach mehrfacher Apherese evt. kein ausreichend großes Transplantat erhalten (Knudsen et al 1998) werden kann.

Bein gesunden Stammzellspendern für das allogene Setting hat sich gezeigt, dass mit einem signifikanten Anstieg der Stammzellen bei einer G-CSF-Tagesdosis zwischen 3 und 24 µg/kgKG nicht vor Tag 3 und mit einem Maximum der Konzentration im peripheren Blut nicht vor Tag 5 zu rechnen ist (Dreger P, Schmitz N 1999). Für onkologischen Patienten nach Polychemotherapie ist für die Stimulation mit G-CSF ein Anstieg ab Tag 5 mit einem durchschnittlichen Maximum am Tag 10 nachgewiesen. Bei der Verwendung von GM-CSF erreichten die CD34+ Zellen ihr Maximum im Schnitt noch weitere fünf Tage später, bei einer Messung der Konzentration ohne Zytokinbehandlung sogar erst sieben Tage später (Weber 1993) verglichen zur G-CSF-Stimulation.

Für die Optimierung der Apherese durch Ermittlung eines möglichst günstigen Apheresezeitpunktes am Apheresetag sind Untersuchungen über eine evt. vorliegende circadiane Rhythmik der CD34+ Stammzellausschüttung und der Hämatopoese im Knochenmark unerlässlich (Woods PA 1995). Die zunächst an Mäusen nachgewiesene circadiane Rhythmik der hämatopoetischen Aktivität des Knochenmarks (Ohdo et al 1998, Ohdo et al 1998a), lässt sich auch für die menschliche Blutbildung nachweisen. Hier ist die Relevanz für die Stimulation der CD34+ Stammzellen jedoch letztlich noch unklar, und gerade für pädiatrische Patienten fehlen wichtige klinische Daten. So zeigt das Knochenmark selbst physiologisch ein Maximum an CD34+ Stammzellen in der Zeit zwischen 10 Uhr morgens und 15 Uhr nachmittags (Abrahamsen JF et al 1998), und einen um das drei- bis fünffach erhöhte CD34+ Zellkonzentration zum Zeitpunkt des Maximum im Vergleich mit circadianen Minimalkonzentration der CD34+ Zellen im Knochenmark (Woods et al 1998). Nicht nur indirekt, über die CD34+ Stamzellen, lässt sich eine circadiane Rhythmik beim gesunden erwachsenen Menschen nachweisen, auch eine direkte Messung des endogenen G-CSF verweist auf das Vorliegen einer solchen Rhythmik. So steigt das G-CSF im peripheren Blut ab 8 Uhr morgens (im Durchschnitt 18 ng/l) kontinuierlich an, um gegen 22 Uhr abends sein Tagesmaximum zu erreichen. Dabei ergeben sich, im Vergleich zum Nadir der Messung, Steigerungen der endogenen G-CSF-Konzentration um 54% bei einem Streubreich zwischen 43%-65% (Jilman et al 1999).

Für erwachsene Patienten ist bekannt, dass es nach einem subcutan applizierten G-CSF-Bolus zu einem Anstieg der CD34+ Zellen im peripheren Blut innerhalb der folgenden 3-7 Stunden kommt. Unabhängig von Alter oder Vorbehandlung wurde hier eine maximale Mobilisierung von CD34+ Zellen ca. 4 Stunden nach dem G-CSF-

Bolus festgestellt (Fischer et al 1994). Demgegenüber stehen jedoch Daten, ebenfalls an erwachsenen onkologische Patienten ermittelt, die ein Tief der CD34+ Stammzellkonzentration für die ersten zwei Stunden nach dem G-CSF-Bolus und ein Maximum zwischen den Stunden sechs bis zehn aufzeigen (Köchling et al 1997). Bei adulten Patienten wurde sogar festgestellt, dass es innerhalb der ersten Stunden nach G-CSF-Gabe (glykosyliert) zu einem Abfall der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut kommt, der sich nach etwa 3 Stunden wieder auf das Ausgangsniveau hebt. Des Weiteren zeigt sich ein signifikanter Abfall der CD34+ Zellen und des GM-CSF-Spiegels, der erst innerhalb von 4 bis 12 Stunden wieder auf das Ausgangsniveau ansteigt. Dementsprechend scheint die Pheresese direkt nach der letzten G-CSF-Gabe nicht sinnvoll (Watts MJ et al 1998).

Bei einer Gruppe von Patientinnen mit Brustkrebs konnte ermittelt werden, dass ein Anstieg der CD34+ Zellen auf G-CSF-Stimulation hin innerhalb der ersten 8-14 Stunden nach Bolusgabe erfolgte. Innerhalb der ersten sechs Stunden zeigte sich bei den Patientinnen ein CD34+ Konzentrationsminimum, wobei dieses unabhängig davon aufzutreten schien, ob man während dieser Zeit eine Apherese durchführte oder nicht (Kiefer T et al 1997).

1.5.2.4 Zytogene Beeinflussung

Jüngere Forschungen an dendritischen Zellen haben gezeigt, dass diese einen direkten Einfluss auf Differenzierung und Proliferation der CD34+ Zellen ausüben. Demzufolge zeigen CD34+ Zellen in vitro in gemeinsamer Kultur mit dendritischen Zellen (insbesondere mit antigenstimulierten OVA-dendritischen Zellen) eine signifikante Proliferationstendenz und eine Bevorzugung der Differenzierung zu Megakaryozyten (Wang Q et al, 2001). Dies eröffnet neue Ansätze der Beeinflussung und Optimierung der Stimulation von CD34+ Zellen.

1.5.2.5 Large Volume Leukapheresis (LVL)

Large Volume Leukapherese, also die gezielte Optimierung der Aphereseausbeute durch einen hohen Blutdurchlauf durch die Apherese-Maschine kann gerade bei extrem leichten Kindern zu einer Verbesserung des Aphereseergebnisses führen (Diaz et al 1998a). Dabei spielt wohl eher die volle Ausbeute der breiten durch Stimulation im Blut befindlichen Stammzellen eine Rolle, als die verstärkte Mobilisierung durch die erhöhte Aphereseleistung selbst. Zudem wird der Apherese an sich, also der Entfernung von Leukozyten und damit von CD34+ Zellen aus dem peripheren Blut, eine die Ausschüttung von CD34+ Zellen stimulierende Wirkung zugeschrieben, die bei erwachsenen Patienten mit unterschiedlichen onkologischen Erkrankungen bei Apheresen von bis zum fünffachen Patientenblutvolumen nachweisbar ist (Bojka P et al 1999).

1.6 Aufgabenstellung

Die Optimierung der Mobilisierung und Apherese der CD34+ Stammzellen zur Transplantatgewinnung für die autologe Stammzelltransplantation ist bereits von unterschiedlichen Standpunkten aus beleuchtet und erforscht wurden. Es wurde beschrieben, welche Bemühungen in vitro und in vivo unternommen wurden, um möglichst viele CD34+ Zellen für das Transplantat und letztlich für eine erfolgreiche Transplantation zu gewinnen. Dabei bleibt jedoch die Datenlage für die pädiatrische Stammzelltherapie weiterhin unklar, da sich nahezu alle Untersuchungen auf die Ergebnisse von erwachsenen Patienten mit Erkrankungen stützen, die vor allem im Erwachsenenalter vorkommen. Speziell für die optimale Wahl des Apherese-Zeitpunktes bei pädiatrisch-onkologischen Patienten liegen bis heute nur wenige Studien vor, die einen Hinweis auf die optimale Gestaltung der Transplantationsvorbereitung geben können.

Daraus ergeben sich für diese Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Welche Verläufe der CD34+ Zellkonzentration unter G-CSF-Stimulation weisen die pädiatrischen Patienten auf, und zu welchem Zeitpunkt ist eine optimale Aphereseausbeute zu erwarten?
2. Kann der Verlauf der Stammzellmobilisierung auch durch Messung anderer hämatopoetischer Parameter (z.B. der Leukozytenzahl) erfasst werden, und so aufwändige Bestimmungsverfahren vermieden werden?
3. Welche generellen Zusammenhänge zwischen dem Verlauf der CD34+ Zellmobilisierung und Patientenparametern können nachgewiesen werden?
4. Wie kann ein Stammzellmonitoring vor Apherese durchgeführt und optimiert werden? Wie viele Messpunkte beim einzelnen Patienten sind nötig bzw. ausreichend, um einen optimalen Apheresezeitpunkt zu bestimmen?
5. Wie ist der potentielle Benefit für den Patienten aus den gewonnenen Daten einzuschätzen?

Zu Beantwortung dieser Fragen soll die Konzentration CD34+ Stammzellen im peripheren Blut zwischen zwei G-CSF-Applikationen über einen Zeitraum von 12 Stunden engmaschig erfasst werden, um einen optimalen Apheresezeitraum einzugrenzen. Diese Ergebnisse sollen sodann mit Patientenalter und -geschlecht, sowie der Art der Grunderkrankung korreliert werden.

2. Patienten, Materialien und Methoden

2.1 Die Patienten

Das Kollektiv der auf Stammzellmobilisierung unter G-CSF-Einfluß untersuchten pädiatrischen Patienten umfasste insgesamt 14 Personen, davon sieben weibliche und sieben männliche. Die unter onkologischen Krankheitsbildern leidenden pädiatrischen Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung zwischen 10 Monaten und 17 Jahren alt, wobei der Altersdurchschnitt bei 7 Jahren und 7 Monaten lag (Median 3 11/12, Mittelwert 7 7/12).

Die durchschnittliche Körpergröße der Kinder betrug 123,94 cm (Median 107 cm, mit Streuung zwischen 72,2 cm und 179 cm), das durchschnittliche Körpergewicht lag bei 31,59 kg (Median 17,7 kg mit Extremwerten zwischen 8,6 kg und 70 kg). Die Körperoberfläche wurde mit Hilfe der bekannten Formel $\sqrt{([\text{Körpergewicht}[\text{kg}] * \text{Körperlänge}/3600]}$ berechnet (Moesteller RD, 1987). Die so errechnete Körperoberfläche der Patienten bewegte sich zwischen 0,42 m² und 1,83 m², wobei der Mittelwert bei 1,02 m² lag (Median 0,71 m²). Der durchschnittliche BMI betrug 17,5 kg/m² (Median 16,5 kg/m²).

Alle Patienten waren mit Chemotherapien gemäß der ihren Krankheiten entsprechenden Therapieprotokollen vorbehandelt und im Rahmen der nach Therapieprotokoll durchgeführten Randomisierung für eine autologe Stammzelltherapie nach Stimulation und Apherese der Stammzellen vorgesehen.

Das Spektrum der Grundkrankheiten umfasste folgende maligne Erkrankungen des Kindesalters:

Erkrankung	
Neuroblastom	8x
Osteosarkom	2x
B-Zell-Lymphom	1x
Ewing-Sarkom	1x
PNET	1x
Rhabdomyosarkom	1x

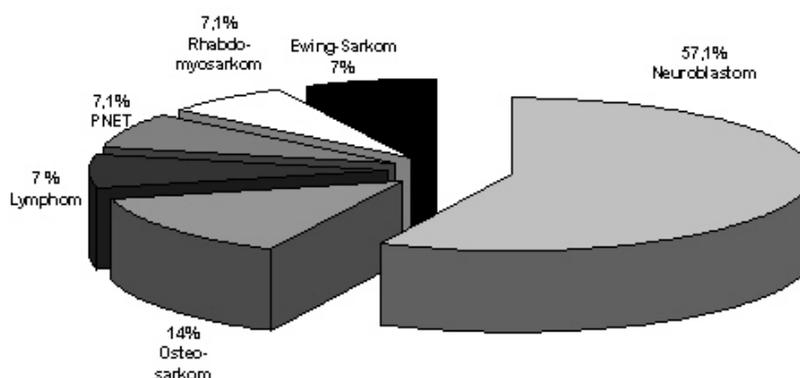


Abb. 2.1 Relative Verteilung der malignen Erkrankungen auf das Gesamtkollektiv der 14 pädiatrischen Patienten.

Bei den Kindern wurden im Durchschnitt 9 Blutentnahmen (maximal 9, minimal 8) in einem Zeitraum von 12 Stunden durchgeführt. Bei einer Patientin wurde das Monitoring auf Wunsch der Eltern nach 9 Stunden abgebrochen; als Grund hierfür wurde von Seiten der Eltern Zeitmangel angegeben. Die zwischen dem 6.9.1998 und dem 18.03.2001 gewonnenen insgesamt 126 venösen Blutproben wurden durch automatisch erstellte Differenzialblutbilder und durchflusszytometrische Analysen in Mehrfachansätzen untersucht.

Die Zeit vom Beginn der Stimulation mit G-CSF bis zum Monitoring in Tagen lag zwischen 5 und 22 Tagen (Median 9; Mittelwert 10,5; Standardabweichung 4,7). Die G-CSF-Dosis pro Kilogramm Körpergewicht und Tag betrug im Durchschnitt 7,3 µg/kg/d, bei Maximalwerten von 4,8 µg/kg/d bis 10,2 µg/kg/d.

Alle Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung in Behandlung der Klinik III mit Schwerpunkt pädiatrische Hämatologie und Onkologie des Zentrums für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Universitätskliniken der J.W. Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Patient	m/w	Alter	KL	KG	KOF	BMI	BE	Beob.- Zeit- raum	Tage Stimulati on	G-CSF/ KgKG/ d	Diagnose
		Jahre	cm	kg	m ²	kg/m ²	Σ	h	d	µg/kg/d	
1	w	1 11/12	82	9,8	0,47	14,57	9	12	17	10,2	Neuroblastom IV
2	w	3 6/12	98	12,5	0,58	13,02	9	9	7	8,3	Neuroblastom IV
3	w	17 3/12	168	68	1,78	24,09	9	12	5	7	PNET
4	w	12 1/12	151	47	1,40	20,61	9	12	10	10	Osteosarkom
5	w	10/12	72,2	8,6	0,42	16,50	9	12	15	6,9	Neuroblastom IV
6	w	1 10/12	105	15,2	0,67	13,79	9	12	5	9,8	Neuroblastom IV
7	w	3 8/12	102	15,6	0,66	14,99	9	12	14	4,8	Neuroblastom IV
8	m	16 6/12	179	61	1,74	19,04	9	12	10	7,8	Rabdomyoskom
9	m	14 1/12	173	70	1,83	23,39	9	12	9	6,8	Ewing-Sarkom
10	m	7 8/12	132	22,4	0,91	12,86	8	12	9	6,7	B-Zell-Lymphom
11	m	17 3/12	163	60	1,65	22,58	9	12	9	8	Osteosarkom
12	m	2 5/12	100	16,7	0,68	16,70	9	12	8	5,9	Neuroblastom IV
13	m	4 3/12	109	18,5	0,75	15,57	9	12	8	5,4	Neuroblastom IV
14	m	3 4/12	101	16,9	0,69	16,57	9	12	22	5,9	Neuroblastom IV
Summe	14										
	7x w										
	7x m										
Durchschnitt		7 7/12	123,94	31,59	1,02	17,45	8,91	11,75	10,5	7,3	
Median		3 11/12	107	17,7	1,02	16,5	9	12	9	6,9	
Maximum		17 3/12	179	70	1,83	24,09	9	12	22	10,2	
Minimum		10/12	72,2	8,6	0,41	12,9	8	9	5	4,8	

Tab. 2.1 Übersicht über das Patientenkollektiv: 14 pädiatrische Patienten mit malignen Erkrankungen, 7 weibliche und 7 männliche, Alterdurchschnitt 7^{7/12} Jahre (Median 3^{11/12}), (m/w= Geschlecht, KL = Körperlänge, KG= Körpergewicht, KOF = Körperoberfläche, BMI =Body Mass Index, Beob.Zeitraum= Dauer des Monitorings in Stunden).

2.2 Materialien

2.2.1 Einwegartikel

2.1.1.1 FACS-Röhrchen

Röhren, No/REF 55.476
5 ml, 75 x 12 mm
(Sarstedt AG& Co, Nümbrecht, Deutschland)

2.1.1.2 Pipettenspitzen

Pipettenspitzen div. Größen
(Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

2.2.2 Geräte und Arbeitsmittel

2.2.2.1 Durchflußzytometer

Coulter Epics XL-MCL
Single Argon Laser
(Beckman Coulter GmbH Coulter, Krefeld, Deutschland)

2.2.2.2 Pipetten

Eppendorf Reference 2 - 20 µl

Volume	Inaccuracy	Imprecision
2 µl	±5,0%	<=1,5%
10 µl	±1,2%	<=0,6%
20 µl	±1,0%	<=0,3%

Eppendorf Reference 10 - 100 µl

Volume	Inaccuracy	Imprecision
10 µl	±3,0%	<=1,0%
50 µl	±1,0%	<=0,3%
100 µl	±0,8%	<=0,2%

Eppendorf Reference 100 - 1000 µl

Volume	Inaccuracy	Imprecision
100 µl	±3,0%	<=0,6%
500 µl	±1,0%	<=0,2%
1.000 µl	±0,6%	<=0,2%

(Angaben der Fa. Eppendorf für destilliertes Wasser, bei Temperaturen zwischen 20-25°C, bei 15 Probemessungen.)

Unter Verwendung von Original Eppendorf Pipetten-Spitzen.
(Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

2.2.2.3 Reagenzglasschüttler

REAX2000

Bewegungsart: Kreisförmig vibrierend

Schüttelfrequenz: 0-2400 l/min , Orbit: 5 mm

(Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim, Deutschland)

2.2.2.4 Zellzählgerät

"Hämatologie-System" Sysmex K-1000

(Sysmex GmbH, Hamburg, Deutschland)

2.2.3 Chemische Reagenzien

2.2.3.1 Hergestellte Reagenzien für die Probenaufbereitung

2.2.3.2 Erythrozytenlyse-Reagenz

Je 8,29g NH₄Cl

1g KHCO₃

37,2mg EDTA-Na²

in 1L destilliertes H₂O, eingestellt auf pH 7,2-7,4)

2.2.3.3 DPBS-Puffer

Vol: 500 ml

Dulbecco's Phosphate

Cat.No: BE17-512F

Lot.No: 2MB0152

(Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien)

2.2.3.4 Reagenzien zum Betrieb des Durchflußzytometers

2.2.3.4.1 Coulter Clenz

Cleaning Agent

(Beckman Coulter GmbH Coulter, Krefeld, Deutschland)

2.2.3.4.2 Isotone II

Isotone Elektrolytlösung
(Beckman Coulter GmbH Coulter, Krefeld, Deutschland)

2.2.4 Antikörper

2.2.4.1 CD 34+ Antikörper

CD34 (Anti-HPCA-2) PE Antikörper
Clone 8G12, Cat. No. 348057
20 µL/10⁶ Zellen
(Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

2.2.4.2 CD 45+ Antikörper

CD45 (Anti-Hle-1) FITC Antikörper
20 µL/10⁶ Zellen
Cat.No. 347463

2.2.4.3 Flow Check Fluorospheres

10 µm Polystyrol-Partikel, Surfactants, Konservierungsstoffe
10 ml/Fläschchen
No. 6605359
(Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

2.2.5 Materialien für die sterile Blutabnahme am Katheter

2.2.5.1 Adaptersystem zur Blutentnahme

Multi-Adapter No. 14.1205
(Sarstedt AG& Co, Nümbrecht, Deutschland)

2.2.5.2 Desinfektionsmittel

Neo-Kodan farblos
(B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

2.2.5.3 EDTA-Röhrchen

S-Monovetten KE (Nr. 05.1167)
2.7 ml , 1.6 mg EDTA/ml

2.2.54 Einmal-Spritzen

Einmalspritzen
5 ml, 10 ml, 20 ml
(B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

2.2.5.5 Heparin

Vetren 200
Wirkstoff: 2 ml (=200 I.E) Heparin-Natrium
(Byk Gulden, Konstanz, Deutschland)

2.2.5.6 Isotone Natrium-Chlorid-Lösung

Isotone Natriumchloridlösung 0,9% Braun
(B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

mit

Mikro Airphil Spike, 5 µm Partikelfilter
(Whatman Wex, Rotenburg/Fulda, Deutschland)

2.2.5.7 Kompressen

Mullkompressen
(Fuhrmann Verbandstoffe GmbH, Neunkirchen, Deutschland)

2.2.5.8 Nadeln

Microlance 3
(Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

2.2.5.9 Sterile Handschuhe

Micro-Touch
(Johnson & Johnson Medical Incl. , Texas, USA)

2.2.6 Blutproben

Als Material für die Analysen sowohl am Zellzähler als auch am Durchflußzytometer wurden Proben von venösem Blut verwendet, welche bei steriler Entnahmetechnik aus einem zuvor gelegten Hickman- oder, Sheldon-Katheter gewonnen wurden. Das Blut wurde mit in den S-Monovetten mit EDTA versetzt.

2.2.7 Arzneimittel

2.2.7.1 Neupogen ®

Das Arzneimittel Neupogen der Firma AMGEN enthält als Wirkstoff **Filgrastim**.

Sonstige Bestandteile: Natriumhydroxid; Sorbitol; Polysorbat 80; Wasser für Injektionszwecke

Zusammensetzung:	Filgastim	300 µg
	Acetat	0.59 mg
	Sorbitol	50.0 mg
	Tween(R) 80	0.004 %
	Sodium	0.035 mg
	Wasser für Injektionszwecke	1.0 ml

2.2.7.2 Vetren 200 ®

Das Arzneimittel Vetren der Firma Byk Gulden, Konstanz, enthält als Wirkstoff **Heparin**

Wirkstoff:	200 ml Heparin - Natrium = 200 i.E. Heparin - Natrium
Hilfsstoffe:	Natriumchlorid Natriumhydroxid Kaliumchlorid Calciumchlorid

Bemerkung: Das Medikament wurde 2002 von Markt genommen; seither Verwendung von Liquimin N5000, Fa. Hoffmann La-Roche AG, Grenzach, Deutschland

2.2.8 Computer und Software

2.2.8.1 Personalcomputer	Highscreen PC 333 MHZ ; Intel Pentium 2 Prozessor
2.2.8.2 Textverarbeitung	Microsoft Word®, Version 2000
2.2.8.3 Tabellenkalkultionssoftware	Microsoft Excel®, Version 1997
2.2.8.5 FACS-Auswertungs-Software	System II-Software
2.2.8.6 BIAS für Windows ®	Version 7.1, Dr. Hanns Ackermann. J.W. Goethe-Universität, Epsilon Verlag

2.3 Methoden

2.3.1 Durchführung des Monitoring

2.3.1.1 Stimulation und Mobilisierung der CD34+ Zellen in den pädiatrischen Patienten

Die Stimulation der CD34+ Zellen bei den 14 pädiatrischen Patienten erfolgte im Anschluss an den jeweils vorausgegangenen Chemotherapieblock nach Therapiestudie. Die Tagesdosis Filgrastim betrug zwischen 4,9 µg/kg/d und 10,8 µg/kg/d, und wurde in einem Bolus subcutan injiziert. Die unterschiedlichen Dosierungen ergaben aus der Tatsache, dass die Eltern häufig die subcutanen Injektionen selbst zu Hause vornahmten. Damit war Compliance und Dosiergenauigkeit abhängig von einer einfach aufzuziehenden G-CSF-Menge (z.B. ganze oder halbe Ampullen). Am letzten Tag vor der Apherese erhielten die Patienten zu Dosisverdopplung zwei solche Tagesdosen im Abstand von je 12 Stunden zu der jeweils vorher durchgeführten subcutanen Injektion. Über das Apheresedatum wurde jeweils nach Messung der CD34+ Zellkonzentration im peripheren Blut entschieden, wobei als unterste Grenze für die Durchführung einer Apherese 20 CD34+ Zellen/µl Blut galten. War diese Mindestzellkonzentration überschritten, wurde der Apheresetag für den nächsten Tag festgelegt, und das Monitoring initiiert.

2.3.1.2 Vorbereitung und Nachbereitung

Vor jedem Monitoring waren eine Reihe vorbereitender Maßnahmen durchzuführen, welche zusammengefasst die Patientenaufklärung, die Betreuung, die labortechnischen Vorbereitungen und die Vorbereitung der Auswertung umfassten. Der Arbeitsplatz im Labor wurde zunächst soweit vorbereitet, dass alle im Abschnitt 2.2 aufgeführten Substanzen und Arbeitsgeräte zur Verfügung standen. Die ordnungsgemäße Funktion der verwendeten Apparate wurde ferner durch Testproben und Gegenmessungen mit anderen Geräten sichergestellt. Das Durchflußzytometer wurde mit Hilfe der Substanzen zur Qualitätskontrolle (FlowCheck) getestet und vorbereitet.

Die Aufklärung der Patienten und deren Eltern erfolgte bereits Tage im Voraus, um so möglichst gute Bedingungen für eine erfolgreiche Zusammenarbeit zwischen Patienten, Eltern, Ärzten, Pflegekräften und Doktorand zu schaffen. Sie wurde zunächst durch ein Gespräch des Oberarztes mit den Eltern und dem Patienten eingeleitet, welches neben dem eigentlichen Ablauf des Monitoring auch Aufklärung über eventuelle Probleme, Nutzen der Untersuchung, sowie die Möglichkeit zur Fragestellung einschloss. Zusätzlich wurde ein weiteres Gespräch zwischen Eltern, dem Patient und dem Doktoranden geführt, welcher die Messung dann auch selbst durchführte. Der Inhalt dieses Gesprächs umfasste die praktische Durchführung sowie den zeitlichen Ablauf des Monitoring. Während des Gespräches wurde dann auch ein Informationsblatt (s. Anhang A) für die Eltern ausgegeben, das im Verlauf der ersten Patienten-Monitorings in Zusammenarbeit zwischen Doktorand und Eltern der Patienten erarbeitet worden war. Der Entwurf eines solchen Informationsbogens für die Patienten selbst erschien nicht sinnvoll, da die Altersspanne des Kollektivs so

groß war, dass sich eine einheitlich verständliche Form nicht finden ließ. Demgegenüber wurde mit jedem Patienten am Tag des Monitoring nochmals, sofern Alter und Zustand dies zuließen, ein Einzelgespräch mit dem Monitoring als Gegenstand geführt, und auch im Verlauf der zwölf Stunden war es den Patienten durchgehend möglich, Fragen zu stellen oder das Monitoring abzubrechen.

Am Tag des Monitoring befanden sich die Patienten zum Teil in Betreuung ihrer Eltern, immer jedoch unter Überwachung durch den Mitarbeiter, welcher die Messungen durchführte. Die Patienten sind während des gesamten Monitoring in der Universitätsklinik anwesend gewesen, entweder Patienten der onkologischen Station oder in der onkologischen Tagesklinik. Zur Motivation der älteren Kinder, und im Sinne einer Aufklärung zum Verständnis des Sachverhaltes, konnten diese in ein für sie vorbereitetes Schaubild den Anstieg der Leukozyten nach der G-CSF-Gabe verfolgen, und waren somit motiviert, selbst herauszufinden, zu welchem Zeitpunkt die Konzentration der Leukozyten in ihrem Blut das Maximum erreichte. Die Möglichkeit eines Biofeedback im Sinne einer positiven Verstärkung des Leukozytenanstiegs wurde hierbei nicht in Betracht gezogen.

Die Auswertung der Messreihe wurde vorbereitet, indem entsprechende Protokolle für die Ergebnismitteilung erstellt wurden. Für die Computerauswertung wurden Tabellen und Protokollvordrucke für jeden Patienten angelegt. Zudem erfolgte die Sammlung relevanter klinischer Daten aus den entsprechenden Krankenakten, wie z.B. der bereits durchgeführten Therapie, der Anzahl zuvor vorgenommener Apherese, der Anzahl der Stimulationstage mit G-CSF, dessen Tagesdosis, Applikationsart usw.

2.3.1.3 Organisation und zeitlicher Ablauf des Monitoring

Mit der ersten G-CSF-Gabe zur Mobilisierung der CD34+ Stammzellen wurde im Normalfall bereits der erste Schritt zur Organisation des Monitoring getroffen, sofern alle oben angeführten Voraussetzungen durch Patienten und Setting erfüllt waren. In den folgenden Stimulationstagen wurde in regelmäßigen Abständen durch das hauseigene Labor die CD34+ Konzentration im venösen Blut des Patienten bestimmt, um somit indirekt ein Maß für den Erfolg der Stimulation und direkt für die Mobilisierung der CD34+ Stammzellen im Patienten zu erhalten. Wenn die Anzahl der Stammzellen/ μl den Wert von 20 Stammzellen/ μl überschritt, erfolgte das oben beschriebene Aufklärungsgespräch mit den Eltern und dem Kind. Der genaue Zeitpunkt des Monitoring, bezogen auf die Anzahl vorausgegangener Tage der Stimulation mit G-CSF, sowie bezogen auf den zeitlichen Abstand zur Apherese der Leukozyten selbst wies individuell stark unterschiedliche Werte auf. Dies ergab sich zum einen aus der sehr individuell variierenden Zeit, die von Nöten war, um bei einem Patienten durch die über Tage verabreichte G-CSF-Dosis einen Anstieg der CD34+ Zellen hervorzurufen; zum anderen musste eine Koordination zwischen dem Patienten bzw. dessen Eltern, der Station und dem durchführenden Mitarbeiter erfolgen, um einen reibungslosen, möglichst standardisierten Ablauf des Monitoring zu gewährleisten.

Alle Monitoring-Daten wurde bei den 14 Patienten zwischen dem 06.09.1998 und dem 18.03.2001 erhoben. Das Monitoring wurde bei allen Patienten innerhalb der

letzten 24 h vor der ersten Apherese des aktuellen Stimulationszyklus durchgeführt. Unmittelbar vor dem entsprechenden subcutanen G-CSF-Bolus wurde eine Blutprobe als 0-Stunden-Wert entnommen.

Kriterien für die Entscheidung zur Durchführung eines Monitoring waren:

- ☞ mehr als 20 CD34+ hämatopoetische Stammzellen/ μl venösen Blutes in mindestens einer vorausgegangenen FACS-gestützten Bestimmung
- ☞ Durchführung des Monitoring möglichst immer innerhalb von 24 Stunden vor der ersten Apherese des aktuellen Stimulationszyklus

Des Weiteren waren von entscheidender Bedeutung die unabdingbare Einwilligung des Patienten bzw. der Eltern direkt vor und während des Monitoring, der allgemeine Gesundheitszustand des Patienten und die Möglichkeit, den Patienten über Nacht stationär in der Klinik unterzubringen.

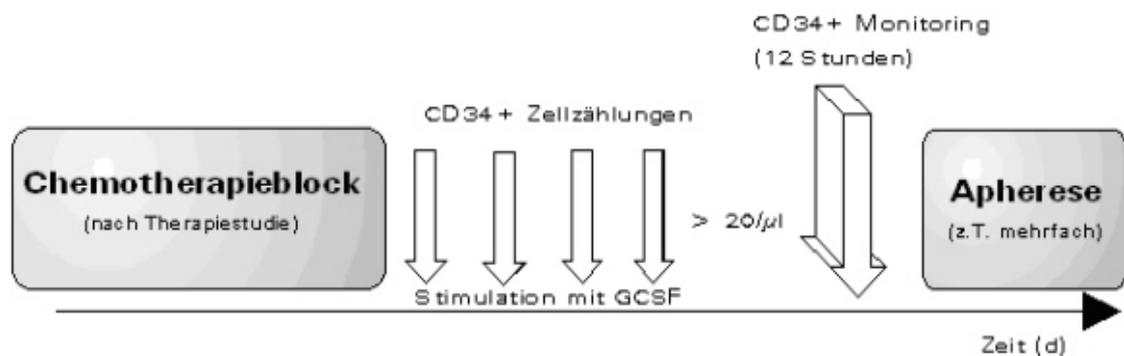


Abb. 2.2 Schema zur Verdeutlichung der zeitlichen Planung des Monitoring. Auf den Chemotherapieblock nach Therapiestudie erfolgte die Mobilisierung der CD34+ Stammzellen mit Hilfe von G-CSF. Regelmäßig durchgeführte CD34+ Zellzahlbestimmungen wurden durchgeführt, bis eine Zellkonzentration von mehr als 20 CD34+ Zellen/ μl im venösen Blut des Patienten erreicht wurde. Danach wurde das CD34+ Monitoring eingeleitet, am Folgetag schließlich die Apherese durchgeführt.

Nachdem die Entscheidung für eine Leukapherese am Folgetag aufgrund einer gemessenen CD34 Zellzahl über 20 Zellen pro μl gestiegen war, wurde in der Regel noch am selben Tag das Monitoring durchgeführt. Abhängig von verschiedenen organisatorischen Bedingungen (z.B. Zeitpunkt der CD34 Zellzahlbestimmung) und dem planmäßig nächsten G-CSF-Bolus wurde der Beginn des Monitoring für 14 Uhr bis 18 Uhr nachmittags angesetzt. Bei der ersten Patientin wurde das Monitoring bereits um 8 Uhr morgens begonnen. Dieses Monitoring über den Tag hinweg erwies sich als ungünstig für die Compliance (Vorzeitiger Abbruch nach 9 Stunden), so dass bei den folgenden Patienten immer die Nacht für das Monitoring genutzt wurde.

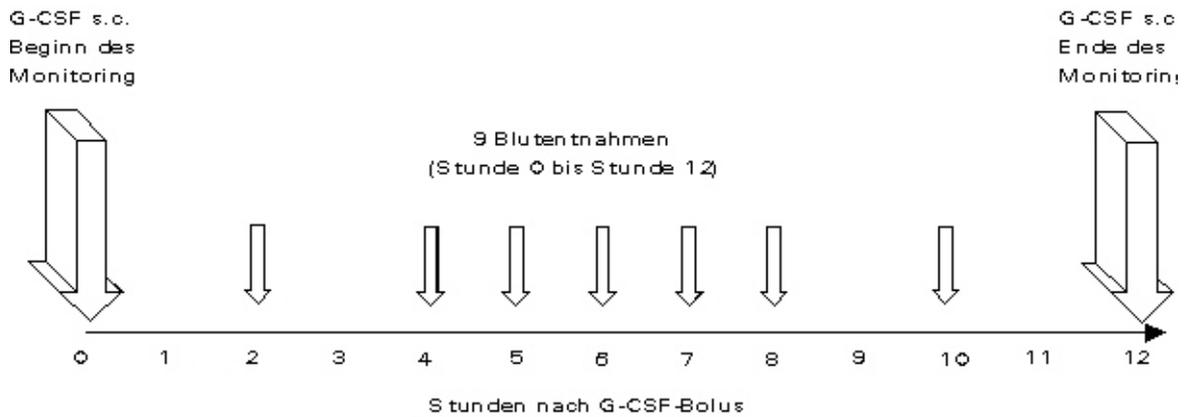


Abb. 2.3 Schema zur Durchführungssystematik des Monitoring. Die Messung der CD34+ Zellkonzentration mit Hilfe der Durchflußzytometrie erfolgte zu Beginn und am Ende des Monitoring (große Pfeile), sowie zur Stunde 2,4,5,6,7,8 und 10 nach der G-CSF-Bolus s.c. (vorletzte G-CSF-Gabe vor der Leukapherese).

Im Anschluss an das Monitoring und die Messungen im Labor wurde ein Kurzbericht für die Station, das Labor und den behandelnden Oberarzt erstellt. Dieser Kurzbericht umfasste neben der tabellarischen Darstellung der Leukozytenkonzentrationen und CD34+ Zellkonzentrationen auch einen kurzen Verlaufsbericht, die grafische Darstellung der Werte und eine vorläufige Auswertung (s. Abb. 2.4). So konnte, Übertragbarkeit auf den Folgetag vorausgesetzt, der Abstand zwischen letzter G-CSF-Gabe und Zeitpunkt der Apherese in Bezug auf das angenommene Maximum der CD34+ Zellkonzentration im peripheren Blut des Patienten sehr genau abgestimmt werden.

2.3.1.4 Die sterile Blutentnahme

Da das Monitoring der Stammzellausschüttung jeweils unmittelbar vor der Stammzellapherese durchgeführt wurde, ergab sich die Möglichkeit, das venöse Blut durch einen zentralen Venenkatheter vom Typ Hickman bzw. Sheldon abzunehmen. Diese waren im Vorfeld zur Durchführung der Chemotherapie oder der Apherese selbst implantiert worden. Eine Blutentnahme für die Zwecke dieser Studie über oben genannte Katheter erschien vor allem deswegen sinnvoll, weil es sich so vermeiden ließ, den Patienten zu Blutentnahme des Nachts zu wecken und Schmerzen zuzufügen. Dies erhöhte die Compliance für die Studie. Durchgeführt wurde die Blutentnahme unter sterilen Bedingungen in den Untersuchungsräumen der pädiatrisch-onkologischen Station am Tage bzw. am Patientenbett während der Nachtruhe.

Nach gründlicher Desinfektion des Katheters und des z.T. aufgrund von Infusionen angeschlossenen Dreiwegehahnsystems wurden zunächst 20 ml Blut entnommen und steril verwahrt. Nun erfolgte die Entnahme von bis zu 1 ml Blut, woraufhin die vorher entnommenen 20 ml dem Patienten reinjiziert wurden. Schließlich wurde das Schlauchsystem mit 15 ml isotoner NaCl-Lösung gespült und, wenn keine Infusion angeschlossen werden sollte, 2 ml Heparin-Natrium (Vetren 200) in den Katheter injiziert, um die Bildung von Blutkoageln zu verhindern. Das Blut wurde in mit EDTA versetzten Blutentnahmeröhrchen entnommen und dann innerhalb der nächsten 6

Stunden in unten beschriebener Art und Weise für die Analyse mittels Durchflußzytometrie vorbereitet. Die sterile Blutabnahme erforderte die Assistenz einer Krankenschwester, eines Elternteils oder des Patienten selbst. Die EDTA-Blutprobe wurde zur Erstellung eines Blutbildes mit Hilfe eines automatischen Zellzählgerätes verwendet, ehe eine weitere Verarbeitung für die durchflusszytometrische CD34+ Bestimmung erfolgte.

Kurzbericht CD34+ Monitoring

Datum: TT.MM.JJ
 Patient: **Name, Vorname** (*Geburtsdatum)
 kgKG: Körpergewicht (kg)
 G-CSF-Gabe: Zeitpunkt der G-CSF Bolusgabe s.c.

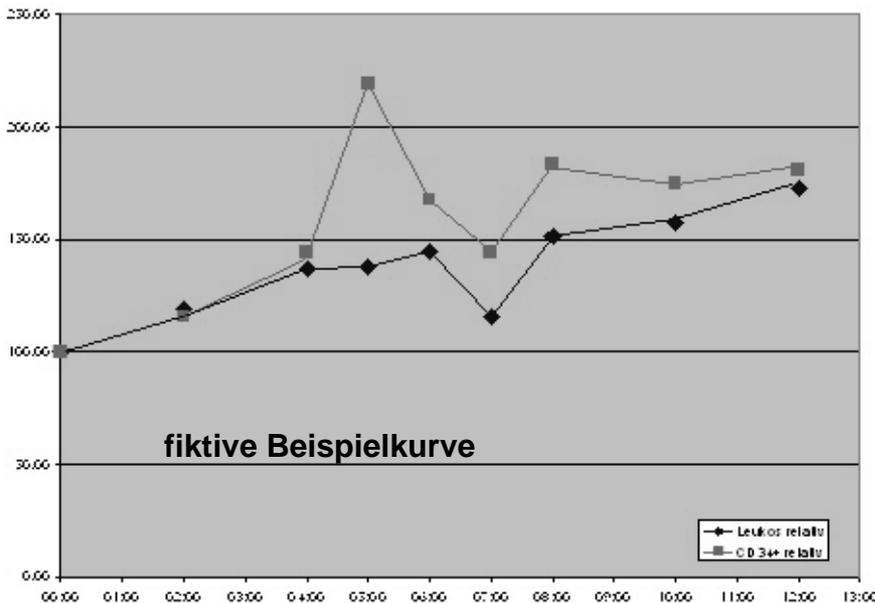
Blutbilder und Proben zur FACS-Analyse:
 (jeweils aus peripherem Blut, venös)

Zeit	h n.	Leukozyten /µl	CD34+ Zellen/µl	Bemerkungen
16:00	0			G-CSF s.c.
18:00	2			
20:00	4			
21:00	5	Leukozyten konzentration	CD34+ Zellkonzentration	Bemerkungen (Nachtruhe, Probleme)
22:00	6			
23:00	7			
00:00	8			
02:00	10			
04:00	12			G-CSF s.c

Kurzer Verlaufsbericht:

Patient: Kurzer Bericht über Wohlbefinden, Compliance und

Labor: Besonderheiten/Probleme der labortechnischen Aufbereitung oder Auswertung



Vorläufige Auswertung:

Kurzer Bericht und wörtliche Darstellung des Laborparameterverlaufs, evt. Kommentare zu einzelnen Werten oder Messungen, und abschließende Gesamtbewertung des Befundes. Kurze Darstellung der Maxima und Minima der Konzentrationsverläufe.

Datum, Name und Unterschrift des Doktoranden

Abb. 2.4 Beispiel für einen fiktiven Kurzbericht zum CD34+ Zellkonzentrations-Monitoring

2.3.2 Labormethodik

2.3.2.1 Durchflußzytometrie

2.3.2.1.1 Analytische Durchflußzytometrie

Die Analyse der durch die Blutentnahmen gewonnenen Proben wurde ausschließlich nach den Auflagen und Anleitungen des Konsensusprotokolls der Arbeitsgruppe "Durchflußzytometrie" der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI) durchgeführt (Gutensohn et al 1996). Bei der Durchflußzytometrie mit gekoppelter computergestützter Auswertung handelt es sich um ein Standardverfahren der Laboranalytik, das schon vielfach beschrieben wurde (Eckardt 1991; Serke et al 1991; Eckard 1993). Daher erfolgt die Beschreibung dieser Technik in Form einer Übersichtsdarstellung.

2.3.2.1.2 Grundlagen der Durchflußzytometrie

Die Differenzierung von Zellen wurde über einen langen Zeitraum hinweg vor allem mit Hilfe von Absorptionsstoffen und nach morphologischen Kriterien am Lichtmikroskop durchgeführt. Diese Untersuchung ist langwierig, erfordert ein Minimum an Erfahrung im Umgang mit dem speziell interessierenden Zellmaterial und ist in ihren Möglichkeiten der Zelldifferenzierung auf morphologisch unterscheidbare Zellen begrenzt.

Diese Einschränkungen in der Untersuchung von Zellen, insbesondere von Blutzellen, können mit Hilfe fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper überwunden werden. Neben der Möglichkeit, auch bei den mit fluoreszierenden Antikörpern markierten Zellen eine Analyse mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes durchzuführen, ergibt sich durch die Einführung der Durchflußzytometrie die Möglichkeit, innerhalb kürzester Zeit eine qualitative und quantitative Aussage über das markierte Zellmaterial zu erhalten.

Grundsätzlich lässt sich die Größe einer Zelle, sowie die Eigenschaft der Granularität (die direkt von der inneren strukturellen Beschaffenheit der Zelle abhängig ist), aus der Streuung eines Lichtstrahles ableiten, welcher auf die betreffende Zelle fällt. Eine zusätzliche Information kann abgeleitet werden, wenn die spezifischen monoklonalen Antikörper, die vor der Messung mit den Zellen inkubiert werden, spezifisch an bestimmte Zellmarker binden, welche ein Entwicklungsstadium oder eine Zelleigenschaft nachzuweisen vermögen.

Mit Hilfe eines Durchflußzytometers ist man in der Lage, beim Durchlauf einer einzelnen Zelle durch ein Kapillarröhrchen im Gerät sowohl die relative Zellgröße und die Zellgranularität mit Hilfe der Lichtstreuung, als auch, vom Analysegerät abhängig, mehrere antikörpergebundene Fluoreszenzfarbstoffe zu registrieren. Der Durchfluss an Zellen kann dabei sehr hoch sein, so dass mehrere zehntausend Zellen pro Minute analysiert werden können. Die Darstellung der so gewonnenen Daten wird durch eine an das Durchflußzytometer angeschlossene EDV-Einheit, meist ein mit spezieller Software ausgestatteter Personalcomputer, vorgenommen, welche eine

grafische Darstellung sowie eine quantitative und qualitative Auswertung der gemessenen Zellen ermöglicht.

2.3.2.1.3 Aufbereitung der Proben für die durchflusszytometrische Analyse (Gutensohn et al 1996)

Die Messung vorbereitende Arbeitsgänge:

Die zu messende Probe wurde zunächst in ein Polypropylengefäß entnommen, welches bereits K3-EDTA als Antikoagulant enthält. Entsprechend den einschlägigen Empfehlungen erfolgte die Lagerung der so entnommenen Proben bei Raumtemperatur, wobei darauf geachtet wurde, dass zwischen dem Zeitpunkt der Entnahme und dem Beginn der Verarbeitung der Probenansätze nicht mehr als 6 Stunden vergangen waren.

Damit bei der Durchflußzytometrie unverfälschte Aussagen über einzelne Zellen gemacht werden können, müssen diese in einer Einzelzellsuspension mit einer Konzentration von ca. $10 \cdot 10^6$ /ml vorliegen. Daraus ergibt sich, dass bei hohen Zellzahlen Verdünnungsschritte mit Puffer notwendig waren, um die erforderliche Konzentration von $1 \cdot 10^4$ Zellen/ μ l zu erhalten.

Die spezifische Markierung der gesuchten hämatopoetischen Stammzellen wurde mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern erreicht, welche sich an die bekannten Zellmarker binden und die spezifisch gesuchte Zelleigenschaft "CD34-Exprimierung" detektierbar machen. Verwendet wurden in diesem Fall zur Charakterisierung der Stammzellen zum einen Antikörper gegen das CD34-Oberflächenantigen hämatopoetischer Stammzellen, zum anderen Antikörper gegen das CD45-Oberflächenantigen der Gesamtleukozytenpopulation.

Die Wahl dieser Antikörper kann als praxiserprobt und allgemein anerkannt aufgefasst werden und stellt in sinnvoller Weise die Stammzellpopulation der Gesamtleukozytenpopulation gegenüber.

Die Inkubation von je 15 μ l Antikörperlösung mit dem wie oben dargestellt verdünnten venösen Blut des Patienten erfolgte dann entsprechend der Herstelleranweisung im Dunklen bei 4°C für 20 Minuten.

Die Verwendung von peripher venösem Vollblut (das zur Verhinderung der Gerinnung mit EDTA versetzt worden ist), macht einen zusätzlichen Schritt in der Vorbereitung der Analyse notwendig, nämlich die Depletion der Erythrozyten. Bei diesem Verfahren, auch "lysis after staining" genannt, werden die Erythrozyten mit Hilfe von EDTA-Ammonium-Chlorid (NH_4Cl , sog. Erylyse) lysiert. Das hierbei verwendete Erylyse-Reagenz wurde jeweils in den Wochen vor den Analysen von einer Medizin-technischen Assistentin unter gleich bleibenden Bedingungen nach der im Materialteil beschriebenen Rezeptur hergestellt.

Das Lyse-Reagenz wurde nun zunächst 10 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit mit der Antikörper-markierten Probe inkubiert; anschließend durchlief die Probe zwei Zyklen von Lyse-Zentrifugationsschritten: dabei wurden die Proben bei 1100 Umdrehungen für 10 Minuten zentrifugiert, anschließend der Überstand verworfen, und das am Boden des Probenbehältnisses verbliebene Pellet aus Leukozyten erneut mit Erylyse-Reagenz versetzt. Nach der dritten Zentrifugation der Probe wurde schließlich kein Erylyse-Reagenz mehr hinzugefügt, sondern SAP-Puffer zum Ab- und Auflösen des Pellets hinzu gegeben.

Die Lagerung der so vorbereiteten Messproben für die Durchflußzytometrie erfolgte erneut bei 4°C in Dunkelheit. Die Messung erfolgte in allen Fällen noch innerhalb von 3-4 Stunden nach der letztem letzten Probenaufbereitungsschritt.

2.3.2.1.4 Die Methodik der Durchflußzytometrie

Eine so entstandene Zellsuspension wird vom Durchflußzytometer über eine Stahlkapillare angesaugt und in die Messkammer geleitet. Dies geschieht im Rahmen einer hydrodynamischen Fokussierung, wobei die Flüssigkeit und die darin befindlichen Zellen auf eine hohe Geschwindigkeit beschleunigt werden, um Zellaggregate aufzulösen und die Zellen hintereinander angeordnet vermessen zu können.

Die Messung der Zellausmaße sowie der Dichte:

Um die Granularität einer Zelle sowie die Größe zu bestimmen, nutzt man den physikalischen Effekt der Lichtstreuung, der auf der Wechselwirkung zwischen einem Lichtstrahl und einem festen Körper, in diesem Fall einer Zelle, beruht. Die Wechselwirkung zwischen Materie und elektromagnetischer Welle verursachen eine Richtungsänderung des Wellenlaufes, nicht jedoch eine Änderung der Wellenlänge derselben. Die Ausmaße der Lichtstreuung an einer Zelle sind vor allem durch die Zellgröße, die Struktur der Zellmembran und die Zellorganellen bzw. Granula bedingt. Fällt nun ein Lichtstrahl auf eine Zelle, so wird das Licht nicht gleichmäßig in alle Richtungen gestreut, sondern es ergeben sich gewisse Eigenheiten, die mit den morphologischen Aspekten der Zelle korrelieren. Abhängig von der Größe der Zelle wird ein bestimmter Anteil des Lichts nach vorne, also in Richtung des einfallenden Lichtstrahles gestreut. Das so genannte forward light scatter (FSC) kann also als Maß für die Zellgröße genutzt werden.

Wird das Licht im rechten Winkel zur Einfallrichtung des Lichtstrahles gestreut, so ist die Ursache dafür in der intrazellulären Granularität zu finden. Dieses Seitwärtsstreulicht wird auch als side scatter (SSC) bezeichnet. Somit sind mit Hilfe des physikalischen Effektes der Lichtstreuung

schon zwei wichtige Informationen zur Einteilung der gemessenen Zellen gewonnen worden (Eckardt 1991, Eckardt 1993)

Die Messung der Fluoreszenz:

Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern können bestimmte, mit entsprechenden Bindungsstellen versehene Zellen, markiert werden, wenn an die Antikörper des weiteren der Partikel eines Stoffes gebunden ist, welcher die Fähigkeit hat, durch elektromagnetische Strahlung selbst zum Leuchten

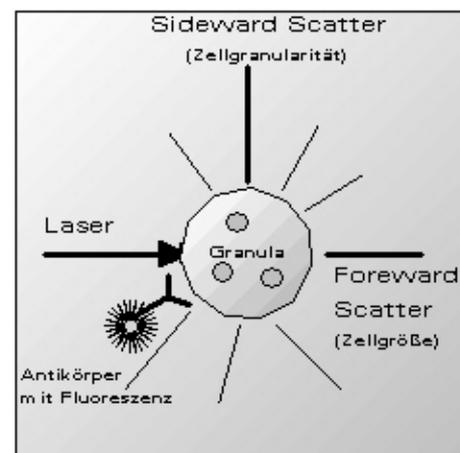


Abb 2.5 Darstellung der Biometrie bei der Durchflußzytometrie. Das Laserlicht wird durch den Messaufbau sowohl bei direktem Durchtritt durch die Zelle (Foreward Scatter), als auch bei Streuung (Sideward Scatter) detektiert. Monoklonale Antikörper mit Fluoreszenzmarkierung ermöglichen die spezifische Markierung von Oberflächenmerkmalen.

angeregt zu werden. Die Eigenschaft dieses Stoffes ist das, was weithin als Fluoreszenz bezeichnet wird.

Fluoreszenz begründet sich auf der Eigenschaft eines Stoffes, elektromagnetische Wellen auf einem für diesen Stoff charakteristischen Wellenlängenbereich zu absorbieren. Mit Hilfe der Energie, welche dieser Strahlung inne wohnt, ist es Elektronen möglich, ein höheres Energieniveau zu erreichen. Der Wellenlängenbereich elektromagnetischer Wellen, welcher die Fähigkeit hat, einen bestimmten Stoff zu eben diesem Elektronensprung anzuregen, wird als Absorptionsspektrum dieses Stoffes bezeichnet; es ist spezifisch für den Stoff.

Durch einen Rücksprung auf das alte, niedrigere Energieniveau, verständlicher Weise mit einer Abgabe von Energie einhergehen muss, emittiert das Elektron ein Photon, also ein sog. Lichtteilchen. Die so entstandene Strahlung entspricht dem, was weithin als Fluoreszenz bezeichnet wird. Da der ganze Prozess, also das Anheben und Absenken der Energie eines Elektrons in den Atomen des beschriebenen Stoffes, ein energieaufwändiger ist, ist das abgestrahlte, also fluoreszierende Licht energieärmer als das, was zu dem Energieniveausprung geführt hat. Dies findet seine Entsprechung in der längeren Wellenlänge, welches das fluoreszierende Licht im Vergleich zum ursprünglich anregenden Licht hat. Der Wellenlängenbereich, in dem Photonen emittiert werden, wird als Emissionsspektrum bezeichnet. Als Lichtquelle für die Anregung der Fluoreszenz wird ein Laserstrahl verwendet, in diesem Fall erzeugt von einem Argon-Laser, der Licht mit der Wellenlänge von 488 nm generiert. Während die Wellenlänge des verwendeten Laserlichtes innerhalb des Absorptionsspektrums des Fluoreszenzfarbstoffes liegen muss, ist die exakte Übereinstimmung mit dem Absorptionsmaximum nicht notwendig. Vom Absorptionsmaximum abweichende Laser-Wellenlängen bedingen dann jedoch eine minder intensive Fluoreszenz.

Durch die Kombination unterschiedlicher Fluoreszenzen bei gleicher Anregbarkeit unter Licht der Wellenlänge 488 nm lassen sich, voneinander differierende Emissionsmaxima vorausgesetzt, mehrere Zelleigenschaften gleichzeitig darstellen. In den hier durchgeführten Versuchen wurde diese Möglichkeit genutzt, um die Expression der mit monoklonalen Antikörpern markierten Zelloberflächenmoleküle CD45 und CD34 gleichzeitig beurteilen zu können. In Kombination wurden hierbei Fluorescein-isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) als Farbstoffe eingesetzt, so dass man von einer Zweifarben-Immunfluoreszenzmessung FITC/PE spricht.

Die Messung der von den Zellen abgegebenen Fluoreszenzsignale erfolgt mit Hilfe von Detektoren, welche die Energie der Lichtimpulse in elektrische Impulse umwandeln und quantifizieren können. Diese Signale können somit an einen Computer weitergegeben und ausgewertet werden.

2.3.2.2 EDV-gestützte Datenerfassung und Auswertung durchflusszytometrisch erfasster Daten

Die für ein Durchflußzytometer spezifische Software ist in der Lage, die durch das oben beschriebene Verfahren erfassten Daten für den Anwender grafisch sichtbar zu machen. Die Datenaufnahme erfolgt im so genannten Listmode, d.h. jedem von Zytometer erfassten Ereignis wird eine Zeile in einer Datenbanktabelle zugeordnet, in der alle erfassten Daten abgespeichert und für die weitere (auch nachträgliche) Verarbeitung bereitgehalten werden. In einer in diesem Fall bevorzugten zweidimensionalen Darstellung kann so jede Zelle in Form eines Pixels in die zwei Dimensionen eingeordnet werden. Unterschiedliche Kombinationen von Koordinatenachsen bzw. Dimensionierungen ermöglichen folglich eine differenzierte Einordnung der Zellen. Die Dimensionierung und Auswahl der Achsenbelegung der Diagramme obliegt dem Benutzer der Software.

In den hier beschriebenen Untersuchungen wurden zweckmäßiger Weise folgende Graphen (jeweils zweidimensional) angelegt:

Forward scatter (Zellgröße)	gegen Sideward scatter (Zellgranularität)
Count (Zellzahl)	gegen Forward scatter (Zellgröße)
Log CD 45 +	gegen Sideward scatter
Log CD 45+	gegen Log CD 34+
Log CD 34+	gegen Sideward scatter (Zellgranularität)

Das so genannte "Gating", ein weiteres Auswertungsverfahren der Software, ermöglicht dem Benutzer neben der grafischen Darstellung auch noch eine nähere Eingrenzung der Zellauszählung und Zellauswertung. Dabei kann der Anwender einen Rahmen (ein sog. "gate") um eine bestimmte, in einem Diagramm grafisch dargestellte Zellpopulation legen, und somit die zu betrachtenden Zellen eingrenzen und zusätzlich auszählen lassen.

Dies ist insbesondere deswegen sinnvoll, da man den einzelnen Populationen der Leukozyten anhand ihrer Eigenschaften Granularität, Größe und natürlich Antikörperbindung Gruppen von Pixeln in der Bildschirmdarstellung zuordnen kann. Somit wird die Spezifität der Methode erhöht. Zelltrümmer und Verunreinigungen werden weitgehend ausgeschlossen.

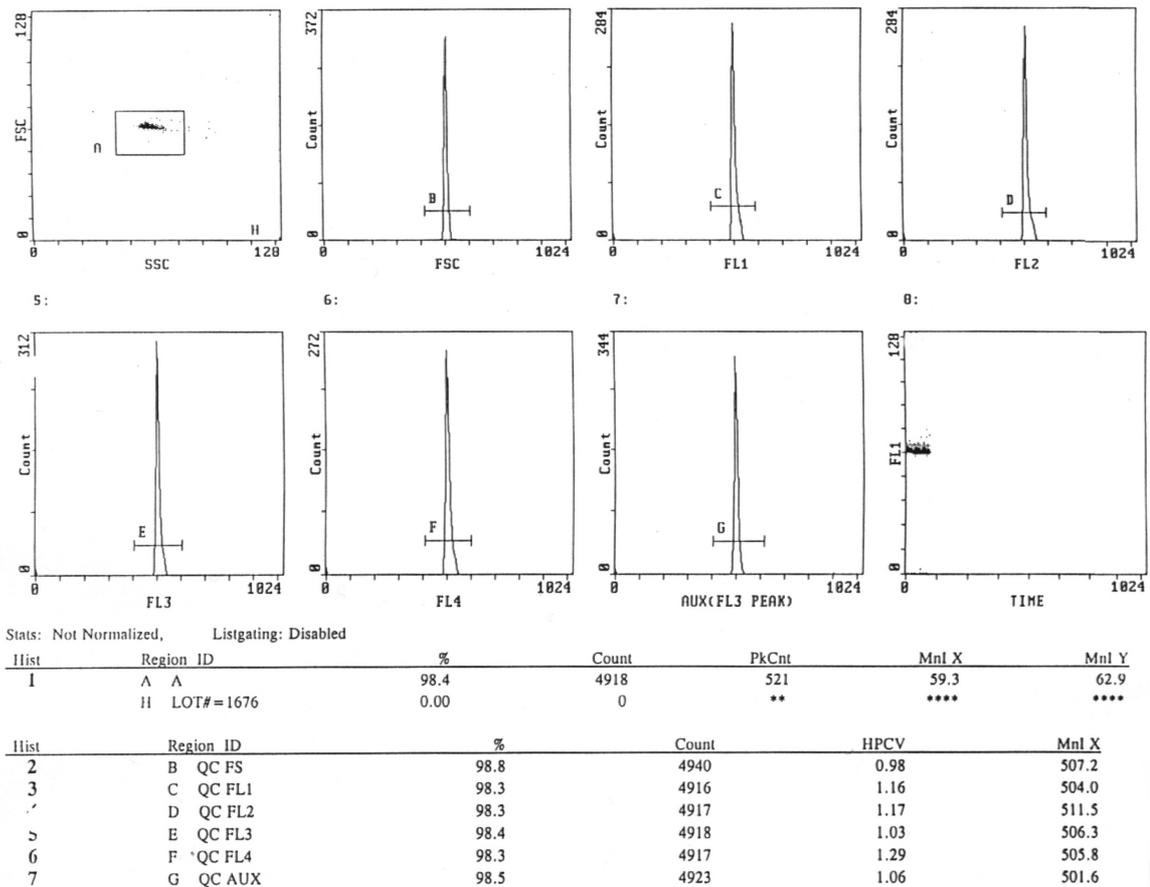


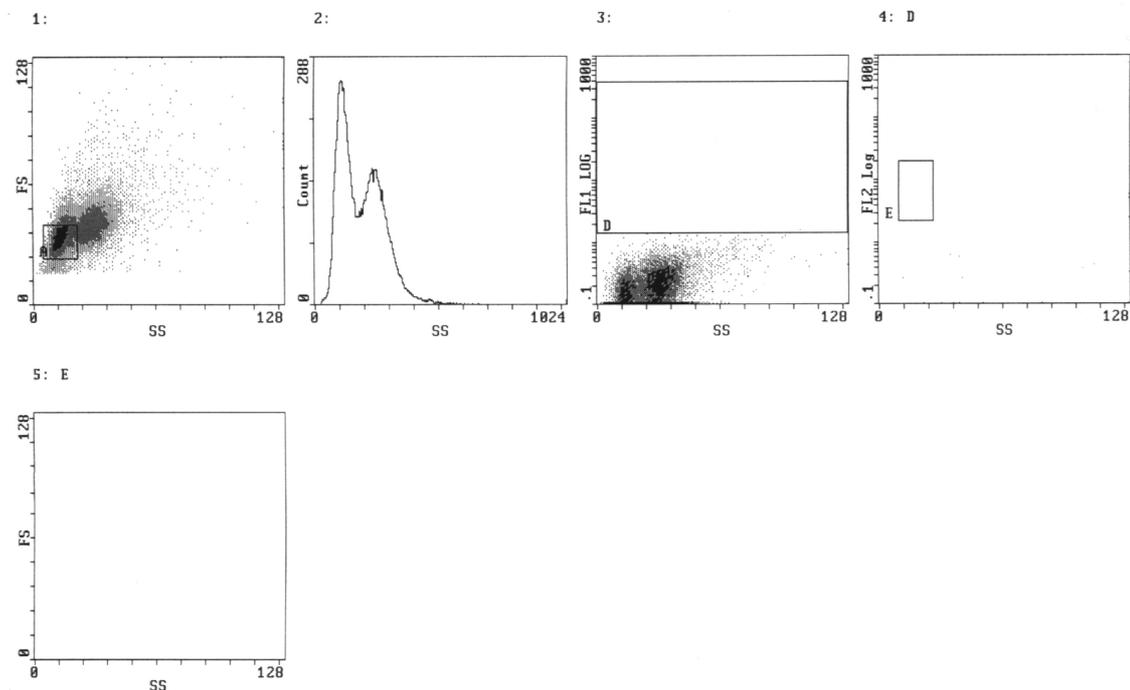
Abb. 2.6 Beispiel für eine sog. Flow-Check vor dem Beginn der durchflusszytometrischen Messungen. Dargestellt sind die acht Messfenster für die unterschiedlichen Einstellungen des Durchflußzytometers: FSC vs. SSC, Summe aller gezählten Ereignisse im FSC, in der Fluoreszenz 1 bis 4, in der zusätzlichen Fluoreszenz und die Darstellung Zählereignisse vs. Zeit. Die definierten Partikel der Flow-Check-Lösung stellen sich als Fluoreszenz-Spitzen im forward-sideward-Diagramm sowie in den einzelnen Fluoreszenzen in dafür definierten Bereichen, sog. „gates“ dar. Solange die Spitzen in den definierten Bereichen bleiben und der HPCV-Wert die Größe 2.0 nicht überschreitet, ist das Zytometer korrekt eingestellt. Entsprechend der Vorgaben des Herstellers überschreitet keine der Fluoreszenzen im HPCV-Wert in dem dargestellten Diagramm den Wert 2.0, alle Spitzen zeichnen sich scharf und eingipflig ab.

Im Vorfeld der Messungen wurden zunächst die für das Gerät vorgesehenen Maßnahmen zur Qualitätssicherung durchgeführt. Dazu zählt neben der ordnungsgemäßen Reinigung und Spülung des Gerätes vor der Benutzung auch die Kontrolle der Zählereinheit und der Auswertungssoftware mit Hilfe so genannter Flow-Check-Partikel, welche mit Hilfe eines vom Geräteproduzenten mitgelieferten Messprofils überprüft werden können. Dieser als „Flow-Check“ bezeichnete Qualitätssicherungsprozess dient der Überprüfung Stabilität des optischen Systems sowie des Ausschlusses verunreinigter Probenwege. Von der bei 4°C aufbewahrte Flow-Check-Fluoreszenz-Substanz werden 15-20 Tropfen zur Messung in ein Messröhrchen überführt und anschließend im Flow-Check-Protokoll bei niedriger („low“) Durchflussrate gemessen. Dabei muss der Variationskoeffizient der halben Meßpeakhöhe (HPCV-Wert) weniger als 2,0 betragen. Bei Werten > 2,0 ist eine Wartung des Gerätes nötig (Abb. 2.6).

OP ID: NAME

39 seconds, 40509 events
Manual Stop

Initial cytosett. from prot. Kikli CD45/34 v.29.5



Stats: Not Normalized, Listgating: Disabled

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	A A	37.9	15363	14.1	33.6	13.0	35.0	169	25.86	13.27
3	D D	0.1	47	74.7	4.66	127.0	1.47	2	54.11	115.76
4	E E	0.0	0	****	****	****	****	**	**	**

Abb. 2.7 Darstellung der Bildschirmausgabe bei einer isotypischen Negativkontrolle. Die Darstellung oben links zeigt eine normale Verteilung der Zellen in der Leukozytenreihe mit sogenannten „Wolken“ für die Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten in der Darstellung FSC vs. SSC. Das zweite Fenster stellt alle Zählereignisse nach deren Granularität (im SSC) dar. Fenster drei zeigt, dass während der nicht mit Antikörpern markierten Iso-Kontrolle keine Ereignisse im Fluoreszenzgate D zu verzeichnen sind. Fenster

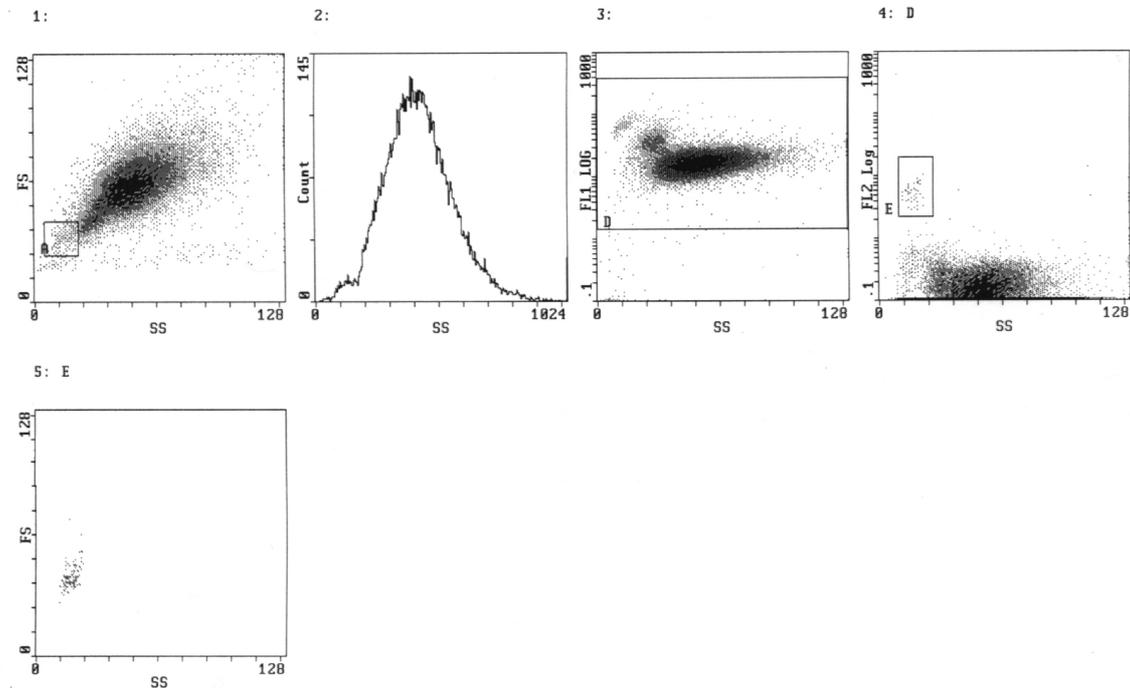
Des weitern wurden bei jedem Messgang zwei isotypische Negativkontrolle mitgemessen. Die Messungen selbst wurden in anfangs in Doppel- später in Dreifachansätzen durchgeführt, um Schwankungen der Messwerte für die Auswertung so gering wie möglich zu halten und möglichen Probleme bei Ansatz und Messung vorzubeugen (s. Abb. 2.7).

OP ID: NAME

42 seconds, 40113 events

Initial cytosett. from prot. Kikli CD45/34 v.29.5

Manual Stop



Stats: Not Normalized, Listgating: Disabled

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	A A	2.2	897	15.9	33.2	22.0	36.0	16	25.04	13.69
3	D D	99.5	39903	52.3	17.2	52.0	15.8	109	33.80	44.38
4	E E	0.4	155	17.9	5.14	15.0	4.99	4	17.14	34.15

Abb. 2.8 Darstellung der Bildschirmausgabe bei einer CD34 /CD45 Zellanalyse. Im ersten Fenster (FSC vs. SSC) erscheinen alle Zellen als Zählereignis, wobei schon hier einzelne Subpopulationen als Wolken zu erkennen sind. Im zweiten Fenster sind die Zählereignisse nach Granularität aufgetragen. Das dritte Fenster zeigt die Zählereignisse, die für die erste Fluoreszenz (FITC) CD45 positiv markiert sind. Durch „gaten“ dieser Zählereignisse können die Leukozyten eindeutig gegen andere Zellen abgegrenzt werden.

Vermessen wurden die Proben Forward-Scatter(FSC) gegen Sideward-Scatter (SSC), Zellzahl gegen Sideward-Scatter, Fluoreszenz 1 Sideward-Scatter, Fluoreszenz 2 gegen Sideward-Scatter. In der Foreward-Sideward-Darstellung können die einzelnen Leukozytenpopulationen bereits voneinander differenziert werden. Nach Granularität staffeln sich die Leukozyten von niedrig nach hoch: Lymphozyten (mit Stammzellpopulation), Monozyten, Granulozyten. Die sich dabei gruppierenden Punktwolken können bereits zur Zellzahlbestimmung, aber auch zum weiteren Eingrenzen der später betrachteten Subpopulationen genutzt werden. Die Gating-Strategie zur Erfassung CD34+ Stammzellen lässt zunächst eine Eingrenzung der Leukozyten mit Hilfe der CD45+ Ereignisse (1. Fluoreszenz) zu. Diese können nun im Auftrag gegen Granularität und 2. Fluoreszenz in CD34+ und CD34- Zählereignisse unterschieden werden. Somit stellen sich die CD34+

hämatopoetischen Stammzellen als die Schnittmenge der CD34+ und CD45+ Zählereignisse dar.

2.4 Statistische Auswertung

2.4.1 Besonderheiten bei der Datenauswertung

Zeitliche Vergrößerung

Aus unterschiedlichen Gründen vor allem logistischer Art erfolgten die Blutentnahmen zum Ende des Monitoring unregelmäßiger als zu Beginn. Wie beschrieben, brach eine Patientin das Monitoring nach Stunde 9 ab. Bei anderen Patienten konnte es durch andere medizinische Indikationen (Infusionswechsel, Medikamentengaben usw.) zu Verzögerungen der Blutentnahme insbesondere bei den Messungen zur Stunde 8 oder zur Stunde 10 kommen. Bei allen hier vorgelegten Individualdaten wurden somit für die Ergebnisse der mit „8 Stunden nach G-CSF-Gabe“ bezeichneten Messungen auch jene Blutentnahmen zur Auswertung hinzugezogen, die aus logistischen Gründen bis zu 45 Minuten später erfolgten. Bei den Daten handelt es sich also um Ergebnisse aus den Messungen zwischen Stunde 8 und Stunde 9. Gleiches gilt für die Daten der Stunden 10, bei in deren Auswertung auch alle Daten hinzugezogen wurden, die zwischen Stunde 10 und Stunde 11 gemessen worden sind.

Plausibilitätskontrolle

Alle Daten wurden nach der Erhebung und vor der Auswertung einer Plausibilitätskontrolle, basierend auf Literatur und eigene Erfahrungen mit der Durchflußzytometrie unterzogen. Dabei wurden Einzelwerte, welche sich der Plausibilität der jeweiligen Messung entzogen, also die Stetigkeit einer Ergebnisreihe unbegründet verließen, auf mögliche Ursachen überprüft und im Zweifelsfall nicht in die Auswertung mit einbezogen. So genannte Ausreißer bei drei parallel angesetzten Messungen wurden vor der Auswertung ebenfalls eliminiert.

2.4.2 Biomathematische Auswertung und Methoden

Arithmetisches Mittel

Das arithmetische Mittel, auch als Mittelwert bezeichnet, wurde unter Annahme einer eingipfligen Normalverteilung eingesetzt. Es errechnet sich aus der Summe aller Werte, geteilt durch deren Anzahl:

$$MW = \sum x / n$$

Standardabweichung

Die positive Quadratwurzel aus den Mittelwerten der quadrierten Abweichung wird als Standardabweichung bezeichnet und ergänzt den Aussagewert des arithmetischen Mittels um das Maß der Abweichung von Mittelwert. Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$s = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

Median

Die Berechnung des Medians wurde bei Verdacht auf Ausreißer der Berechnung des Mittelwertes vorgezogen. Er gibt den Beobachtungswert an, der die Gruppe von Werten in zwei gleichgroße Hälften teilt. Die Schätzung erfolgt nach der Formel:

$$\hat{x} = \bar{U} + b \left(\frac{n/2 - (\sum f)_{\bar{U}}}{f_{\text{Median}}} \right)$$

mit \bar{U} als untere Grenze der Medianklasse, b als Klassenbreite, n als Anzahl der Werte, $(\sum f)_{\bar{U}}$ als Summe der Häufigkeitswerte aller Klassen unterhalb der Medianklasse und f_{Median} als die Anzahl der Werte in der Medianklasse.

Geometrisches Mittel

Das geometrische Mittel wurde bei allen Berechnungen relativer Daten zueinander, also insbesondere der relativen CD34+ Zellkonzentration und Leukozytenkonzentration in Bezug auf den jeweiligen Ausgangswert angewendet. Die Berechnung erfolgt mit Hilfe der Formel :

$$\bar{x}_G = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 \cdot \dots \cdot x_n}$$

wobei n für die Gesamtzahl der Werte x_1 bis x_n steht.

Gleitender Durchschnitt

Der Gleitende Durchschnitt wurde im Sinne einer Trendlinie zur geglätteten Darstellung von Kurvenverläufen verwendet, so dass Maxima und Minima in den Verläufen deutlicher hervortreten. Die Werte der Funktion „Gleitender Durchschnitt berechnen sich mit Hilfe der Funktion:

$$F_t = (A_t + A_{t-1} + \dots + A_{t-n+1}) / n$$

mit A als Wert zum Zeitpunkt t . Das Ergebnis ist F_t als prognostischer Wert zum Zeitpunkt t .

Definition Verlaufsmaximum und Verlaufsminimum

In den Verläufen der gemessenen Werte wurde als Maximum jeder Wert bezeichnet, der signifikant größer war als der Wert der Messungen unmittelbar vor und nach der betreffenden Messung.

In den Verläufen der gemessenen Werte wurde als Minimum jeder Wert bezeichnet, der signifikant niedriger war als der Wert der Messungen unmittelbar vor und nach der betreffenden Messung.

Werte, die zur Stunde 0 nach G-CSF-Gabe höher bzw. niedriger lagen als in der darauf folgenden/vorangegangenen Messungen, wurden in der Auswertung der Leukozytendaten ebenfalls als Maximum bzw. Minimum gewertet.

2.4.3 Mathematische Tests (Sachs L 1996, Ackermann H 1997)

Craddock-Flood-Test

Der Test untersucht für bis zu 5 Zeilen und Spalten die Abhängigkeit von kategorialen Merkmalen, in diesem Falle z.B. Neuroblastompatienten vs. andere maligne Erkrankungen mit Mobilisierungstypen I-IV. Er wurde anstatt des häufiger verwendeten Chi²-Tests gewählt, um den kleinen Fallzahl der einzelnen Untergruppen gerecht zu werden.

Pearson-Korrelation

Der Pearsonsche Korrelationskoeffizienten wurde zur Aussage über die Stärke des Zusammenhangs zwischen zwei Klassifikationsmerkmalen einbezogen. Bei völliger Unabhängigkeit hat der Korrelationskoeffizient r den Wert 0, bei völliger Abhängigkeit einen Wert zwischen 0 und 1 abhängig von der Anzahl der Felder der Kontingenztafel. Dazu wird für jede Kontingenztafel der größtmögliche Kontingenzwert angegeben.

Der Korrelationskoeffizient r errechnet sich nach:

$$r = \sqrt{\frac{\chi^2/n}{\chi^2/n + 1}}$$

2.4.4 Fehlerquellen

Patientenkollektiv

Für eine auf Signifikanzerfassung ausgerichtete statistische Auswertung war das hier vorgestellte Patientenkollektiv aufgrund der kleinen Fallzahl und der sehr individuellen Voraussetzungen wie Verläufe als eher ungeeignet einzustufen. Obwohl eine Unterteilung des Kollektivs in verschiedene Untergruppen vorgenommen wurde, muss betont werden, dass die Aussagekraft der Ergebnisse eben wegen der kleinen Fallzahl als begrenzt erachtet werden muss.

Durchflusszytometrische Messungen

Fehler bei der Erhebung von Daten durch durchflusszytometrische Messungen sind durch eine sinnvolle Gating-Strategie weitgehend zu vermeiden. Unspezifische Bindungen, Zelltrümmer und Zellkonglomerate jedoch können in geringem Maße die Messergebnisse verfälschen. Ebenfalls ist die Anzahl der in ein Gate eingeschlossenen Ereignisse in einer geringen Schwankungsbreite vom Untersucher abhängig.

Es wird darauf hingewiesen, dass die Durchflußzytometrie mit der Entwicklung neuer Geräte (mehr und neuere Laser, Vielfarbanalysen), verbesserter Software und

gesteigerter Qualitätssicherung heute bereits eine wesentlich genauere Messung und Auswertung ermöglicht als zum Zeitpunkt der Datenerhebung dieser Arbeit.

Monitoring-Unterbrechung

Das Monitoring wurde von Patient 2 nach 9 Stunden abgebrochen, so dass zwar der Verlauf der hämatologischen Messwerte dargestellt wird, alle gemittelten Werte nach Stunde 9 jedoch nur auf 13 Patienten bezogen werden können.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse des Monitoring nach einzelnen Messparametern

3.1.1 Messung der Leukozytenkonzentrationen

Die Leukozytenkonzentration im venösen Blut der 14 hier untersuchten Patienten wurde maschinell innerhalb von zwei Stunden nach der Entnahme aus dem Katheter des Patienten ermittelt. Insgesamt wurden auf diese Art und Weise 126 Leukozytenkonzentrationen erfasst. Als Referenzwert für die Normalwerte der Leukozytenkonzentrationen gelten im Labor $4,1 \cdot 10^3$ Zellen/ μl bis $10,9 \cdot 10^3$ Zellen/ μl ; diese Normalwerte wurden aufgrund der Grundkrankheiten der Patienten häufig über- bzw. unterschritten.

Die maximal gemessene Leukozytenkonzentration lag bei $46,4 \cdot 10^3$ Zellen/ μl , das Minimum konnte mit $3,9 \cdot 10^3$ Zellen/ μl festgestellt werden. Im arithmetischen Mittel betrug die Leukozytenkonzentration bei den Kindern bei $16,1 \cdot 10^3$ Zellen/ μl bei einer Standardabweichung von 10,4. Der Median dieser Messungen lag bei 13,15.

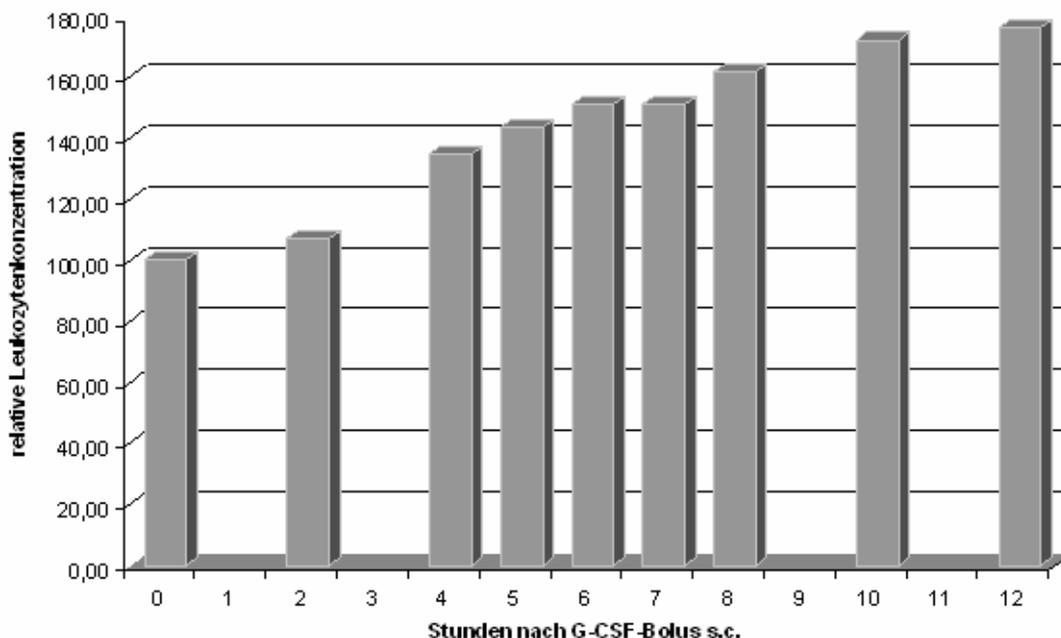


Abb. 3.1 Geometrisches Mittel der Leukozytenkonzentrationen im peripheren Blut von 14 pädiatrischen Patienten, aufgetragen gegen die Stunden nach G-CSF-Gabe subcutan. Dargestellt wird der aus den Monitoring-Werten aller Patienten geometrisch gemittelte Verlauf der Leukozytenkonzentrationen über 12 h. Als Ausgangswert (entspricht 100%) wird die Leukozytenkonzentration vor der ersten G-CSF-Gabe zur Stunde 0 angenommen, alle weiteren ermittelten Werte werden in ihrer relativen Höhe zum Ausgangswert dargestellt.

Patient	0	2	4	5	6	7	8	10	12	Mittelwert	Stabw	Media n
	24,6	4,6	4,2	4,1	5,4		6			4,93	0,82	4,6
	1025	25,8	36,6	39,6	38,5	45,2	46,4		31	36,01	8,13	37,55
	326,4	25,5	34,5	35,9	41,1	35,1	34,1	33,5	32,5	33,18	4,77	34,1
	610,5	10,8	11,5		13,5	15,5	16,8	18,8	19,7	14,71	3,39	15,3
	43,20	4,80	6,10	7,40	7,70	8,70	9,70	12,60	13,2	8,43	3,26	8,2
	118,00	8,50	8,60	8,60	8,90	9,50	9,90	10,40	10,30	9,19	0,86	8,9
	89,40	7,70	15,00	16,00	18,50	17,70	18,20	17,00	15,80	15,03	3,87	16
	53,60	5,60	5,40	3,90	4,30	4,50	4,80	5,30	5,50	4,77	0,73	4,8
	910,50	11,00	13,10	14,20	14,50	17,00	18,40	22,90	22,7	16,03	4,59	14,5
	716,90	16,20	17,90	18,70	19,70	19,50	18,70	20,00	21,3	18,77	1,59	18,7
	128,60	11,30	12,30	13,80	14,80	14,00	17,20	15,60	18,30	13,99	2,99	14
	122,10	26,30	30,20	30,40	31,90	25,50	33,50	34,80	38,10	30,31	5,00	30,4
	136,00	6,20	8,40	9,52	10,50	10,60	10,30	11,90	13,80	9,69	2,53	10,3
	147,24	5,14	10,3	11,9	11,9	11,1	11,5	10,8	9,2	9,9	2,32	10,8

Tab. 3.1 Wertetabelle Leukozytenmessungen (Individualliste), aufgetragen gegen die Anzahl der Stunden nach G-CSF-Gabe. Angaben in 1000 Leukozyten/ μ l venöses Blut.

Patient	0	2	4	5	6	7	8	10	12	Mittelwert	Stabw	Media n
2	100,00	100,00	91,30	89,13	117,39		130,43			105,97	17,86	100,00
10	100,00	103,20	146,40	158,40	154,00	180,80	185,60		124,00	140,67	32,51	150,20
3	100,00	96,59	130,68	135,98	155,68	132,95	129,17	126,89	123,11	124,46	18,06	129,17
6	100,00	102,86	109,52		128,57	147,62	160,00	179,05	187,62	136,76	32,25	145,71
4	100,00	150,00	190,63	231,25	240,63	271,88	303,13	393,75	412,50	243,25	101,79	256,25
11	100,00	106,25	107,50	107,50	111,25	118,75	123,75	130,00	128,75	114,41	10,80	111,25
8	100,00	81,91	159,57	170,21	196,81	188,30	193,62	180,85	168,09	153,93	41,21	170,21
5	100,00	155,56	150,00	108,33	119,44	125,00	133,33	147,22	152,78	130,94	20,41	133,33
9	100,00	104,76	124,76	135,24	138,10	161,90	175,24	218,10	216,19	147,30	43,70	138,10
7	100,00	95,86	105,92	110,65	116,57	115,38	110,65	118,34	126,04	110,68	9,40	110,65
12	100,00	131,40	143,02	160,47	172,09	162,79	200,00	181,40	212,79	159,07	34,72	162,79
1	100,00	119,00	136,65	137,56	144,34	115,38	151,58	157,47	172,40	135,43	22,64	137,56
13	100,00	103,33	140,00	158,67	175,00	176,67	171,67	198,33	230,00	156,20	42,13	171,67
14	100,00	70,99	142,27	164,36	164,36	153,31	158,84	149,17	127,90	132,6	32,06	149,17

Tab. 3.2 Relative Leukozytenkonzentrationen (Individualliste), bezogen auf den jeweiligen Ausgangswert (0-Stunden-Wert) und aufgetragen gegen die verstrichenen Stunden nach der ersten G-CSF-Gabe. Die Umrechnung in relative Werte bezieht sich auf den jeweiligen Ausgangswert zur Stunden 0 nach G-CSF-Gabe. Dadurch ergeben sich sinnvolle Vergleichswerte.

1	Neuroblastom IV	16	72	16	72
2	Neuroblastom IV	2,2	53	1,7	36
5	Neuroblastom IV	1,9	53	1,9	53
6	Neuroblastom IV	9,2	87	9,2	87
7	Neuroblastom IV	4,2	29	3,7	23
12	Neuroblastom IV	9,7	113	9,7	113
13	Neuroblastom IV	7,8	130	7,8	130
14	Neuroblastom IV	6,7	127	2,0	28
3	PNET	15,6	61	8,3	31
4	Osteosarkom	11,2	339	11,2	339
11	Osteosarkom	2,3	35	2,3	35
8	Rhabdomyosarkom	8,8	94	6,4	68
9	Ewing-Sarkom	1,9	53	1,9	53
10	Ewing-Sarkom	21	86	6	24

Tab. 3.3 Die Tabelle beschreibt für jeden Patienten die Grunderkrankung, die Differenz der Leukozytenkonzentration zwischen Konzentrationsmaximum und Konzentrationsminimum sowohl als absolute Zellzahl, als auch als relativen Wert bezogen. Zudem wird die Differenz der Leukozytenkonzentration zu Beginn des Monitoring (Stunde 0) und zum Ende des Monitoring (Stunde 12h) als absoluter und relativer Wert angegeben.

Das geometrische Mittel der relativen Leukozytenkonzentrationen lag bei 139 %, bezogen auf die Ausgangs-Leukozytenkonzentrationen zum Beginn der Messung. Alle Patienten zeigten einen Anstieg der Leukozytenkonzentration über die beobachteten 12 Stunden hinweg, der zwischen 1700 Leukozyten/ μ l und 16000 Leukozyten/ μ l lag. Dies gibt zwar die grundsätzliche Entwicklung der Leukozytenkonzentrationen bei den Patienten wieder, es ergaben sich jedoch unterschiedliche individuelle Verläufe der Leukozytenkonzentrationen bezogen auf den Zeitpunkt und die Höhe der maximalen und minimalen Leukozytenkonzentrationen während des Monitoring.

Die Verteilung der Maximalwerte und Minimalwerte der Leukozytenkonzentrationen im peripheren Blut zeigt die in Abbildung 3.2 dargestellte Verteilung. Daraus ergibt sich für die Maximalkonzentrationen, dass bei 10 der vierzehn Patienten (71%) das Maximum der Leukozyten erst mindestens 9 Stunden nach dem G-CSF-Bolus erreicht wurde, bei 43% (sechs von vierzehn) sogar erst zur Stunde 12. Dabei wiesen 5 der 14 Patienten eine Leukozytenkonzentrationskurve mit genau einem Maximum auf. Weitere drei Patienten wiesen ein Maximum bei Stunde 5 bzw. Stunde 6 auf. Die Minimalkonzentrationen betreffend konnten festgestellt werden, dass 64% der Patienten (neun von vierzehn), das Minimum der Leukozytenkonzentration zur Stunde 0 aufwiesen, also vor dem subcutanen G-CSF-Bolus, und dass diese innerhalb der nächsten 12 Stunden nicht wieder auf einen niedrigeren Wert als den Ausgangswert absank. 29% der Patienten (vier von vierzehn) zeigten ein Leukozytenkonzentrationsminimum um die Stunde 2 nach G-CSF-Gabe.

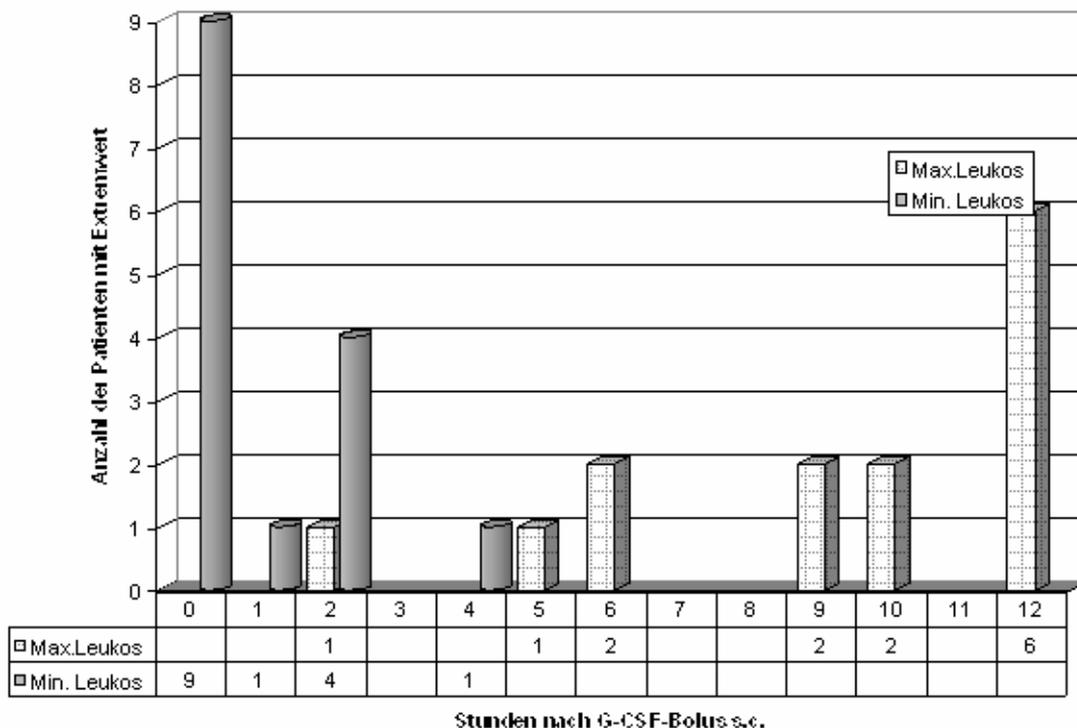


Abb. 3.2 Leukozytenkonzentration im venösen Blut: Maxima und Minima in 12 h nach G-CSF-Bolus. Darstellung der Patientenzahl, die zu einem bestimmten Zeitpunkt ein Maximum oder Minimum ihrer Leukozytenkonzentrationen aufwiesen. Die minimalen Leukozytenkonzentrationen sind bei allen Patienten bis zur Stunde 4 nach G-CSF zu finden, die meisten Maximalen Leukozytenkonzentrationen finden sich ab Stunde 6 nach G-CSF-Gabe.

Des Weiteren zeigte sich, dass 100% (vierzehn von vierzehn) der Patienten das absolute Minimum ihrer Leukozytenkonzentration innerhalb der ersten vier Stunden nach Monitoringbeginn aufwiesen, dementsprechend kein solches Minimum später als Stunde 4 auftrat. Die Minimalkonzentrationen der Leukozyten war in neun der vierzehn Fälle am Nullpunkt der Messreihe gegeben, in den fünf Fällen, in denen es zu einem weiteren Abfall der Leukozytenkonzentration kam, sank die Konzentration nie um mehr als 30% des Ausgangswertes ab. Bemerkenswert erscheint, dass die drei Patienten, die in den Stunden 5 und 6 nach G-CSF Gabe eine maximale Leukozytenkonzentration im peripheren Blut aufwiesen, also eher ein frühes Maximum bezogen auf das Gesamtkollektiv zeigten, die selben Patienten waren, welche ihr Minimum erst bei Stunde zwei, also eher spät in Bezug auf das Gesamtkollektiv aufwiesen.

Ein Sonderfall stellte die Patientin dar, die das Monitoring verfrüht abgebrochen hatte, da sie zweimal denselben Minimalwert erreichte, einmal zur Stunde 1 und einmal zur Stunde 5 des Monitoring.

Zur Verlaufsbeobachtung der Leukozytenwerte ist festzustellen, dass die Leukozytenkonzentrationsverläufe der 14 Patienten über den zwölfstündigen Beobachtungszeitraum hinweg zwar individuell stark voneinander abweichen, dass

sich aber ihr grundsätzlicher Verlauf, im Sinne eines gleitenden Durchschnitts, in unterschiedliche Kategorien einordnen lässt. Die Trendlinienanalyse zeigt, dass drei der 14 Patienten einen durchgehenden Anstieg der Leukozytenkonzentrationen über den gesamten Messzeitraum hinweg aufweisen (einfacher Anstieg). Nur zwei Patienten entwickelten einen Konzentrationsverlauf mit einem einfachen Maximum (einfaches Maximum). Vier Patienten weisen als Charakteristikum einen anfänglichen Abfall der Leukozytenkonzentrationen mit einem Minimum, und erst nachfolgend ein Konzentrationsmaximum auf (Minimum-Maximum). Weitere fünf Patienten zeigten einen Konzentrationsverlauf, bei dem ein Minimum auf ein anfängliches Maximum folgte, um anschließend erneut in einen Anstieg der Werte überzugehen (Maximum-Minimum-Verlauf).

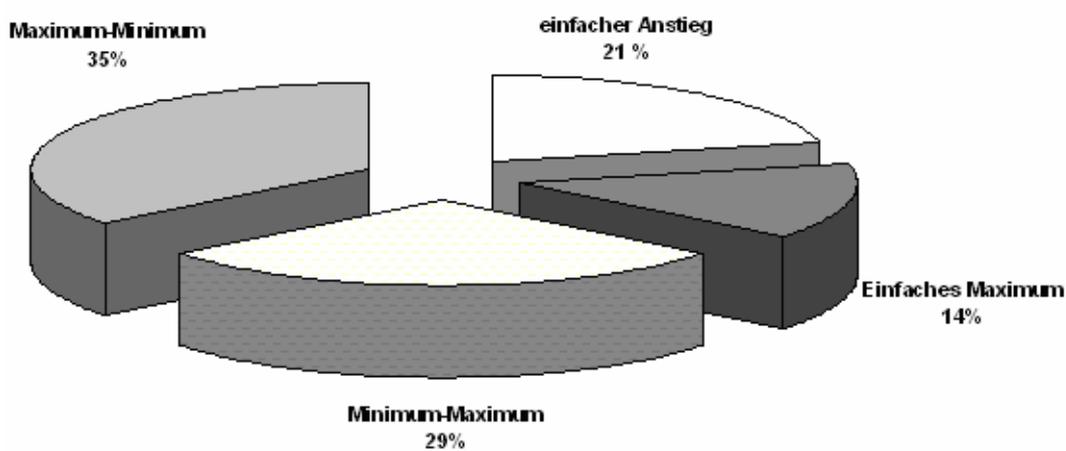


Abb. 3.3 Relative Häufigkeit der vier verschiedenen Leukozytenkonzentrationsverläufe. „Einfacher Anstieg“, beschreibt eine stetig Leukozytenkonzentration über alle 12 h des Monitoring. „Einfaches Maximum“, entspricht genau einem Anstieg, gefolgt von genau einem Abfall der Leukozytenkonzentration während der 12 h des Monitoring. „Maximum-Minimum“ beschreibt einen Anstieg mit Anfall und erneutem Anstieg der Konzentration, genau gegenteilig verläuft ist ein „Minimum-Maximum“-Verlauf zu beschreiben. Einfache Minimum-Konfigurationen konnten nicht beobachtet werden.

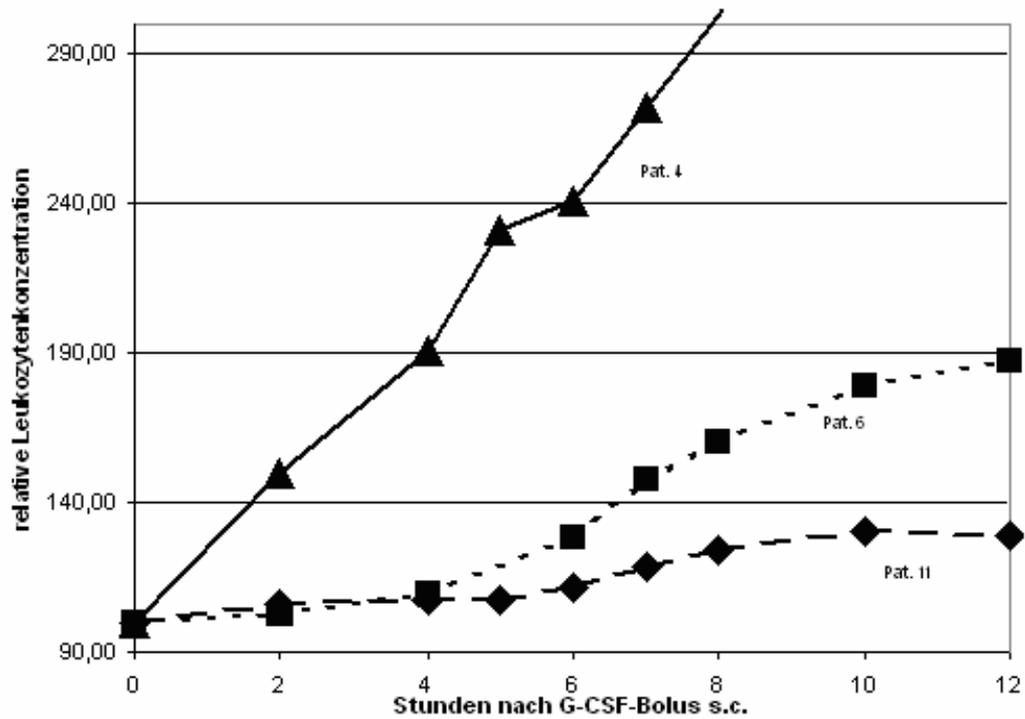


Abb. 3.4 Individuelle Leukozytenkonzentration im venösen Blut bei drei Patienten, die einen stetigen Anstieg der Leukozytenkonzentration verzeichnen ließen. Jeder gemessene Wert war niedriger als der darauf folgend gemessene.

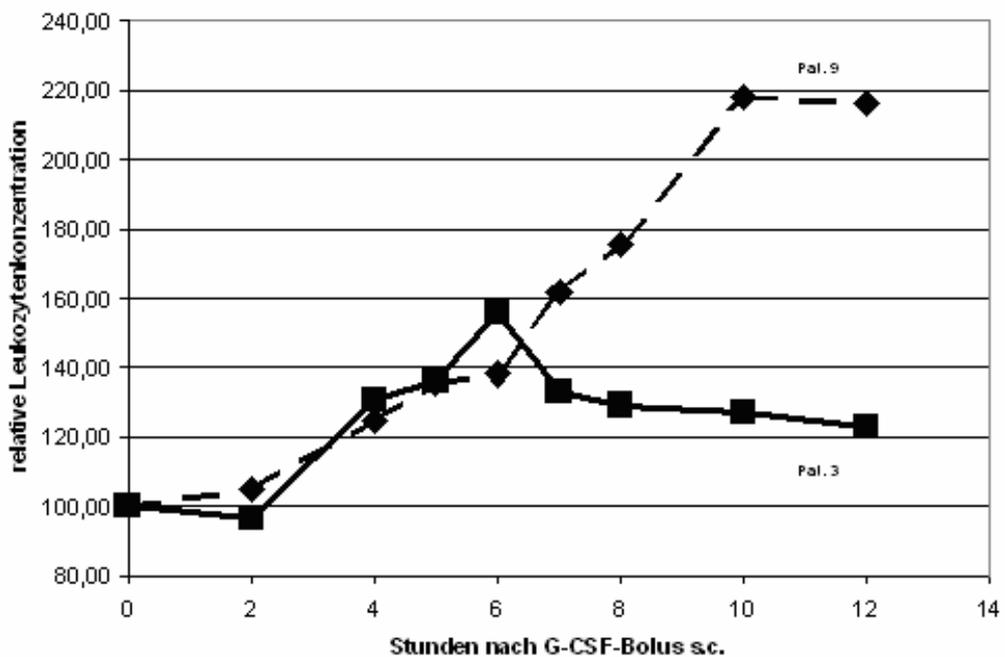


Abb. 3.5 Individuelle Leukozytenkonzentration im venösen Blut bei zwei Patienten, die ein einfaches Maximum der Leukozytenkonzentration aufwiesen.

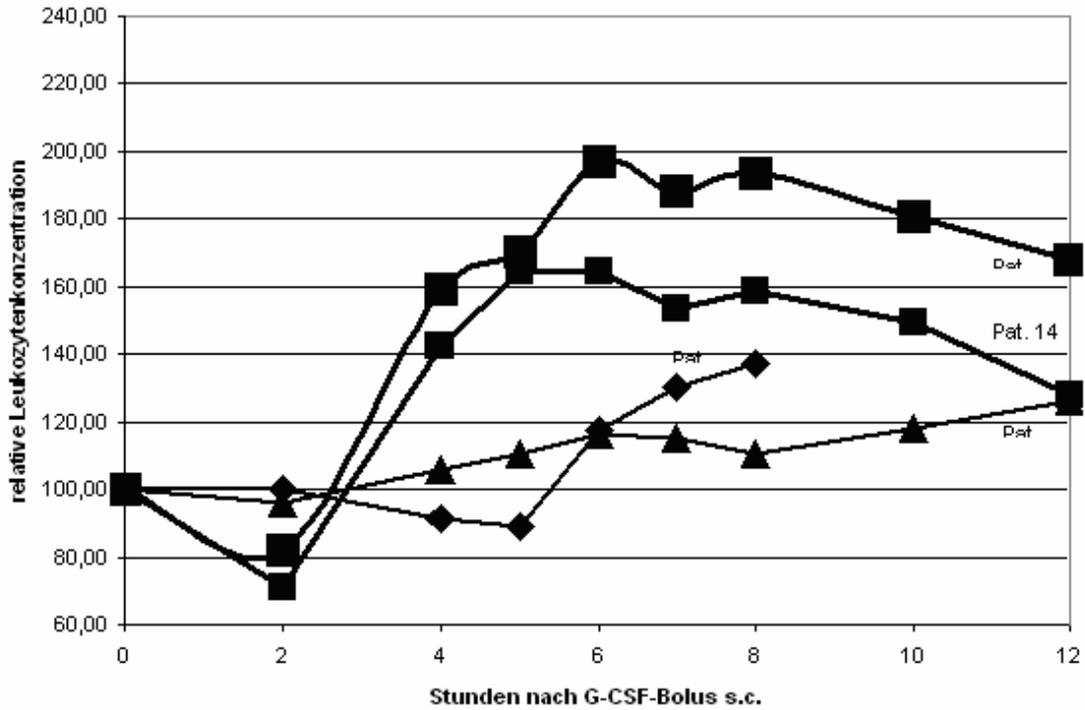


Abb. 3.6 Individuelle Leukozytenkonzentration im venösen Blut bei vier Patienten, die zunächst einen Abfall mit Minimum der Leukozytenkonzentration aufweisen, dem sich ein Maximum anschließt. In dieser Gruppe befindet sich auch die Patientin, die das Monitoring verfrüht abgebrochen hat (Pat. 2).

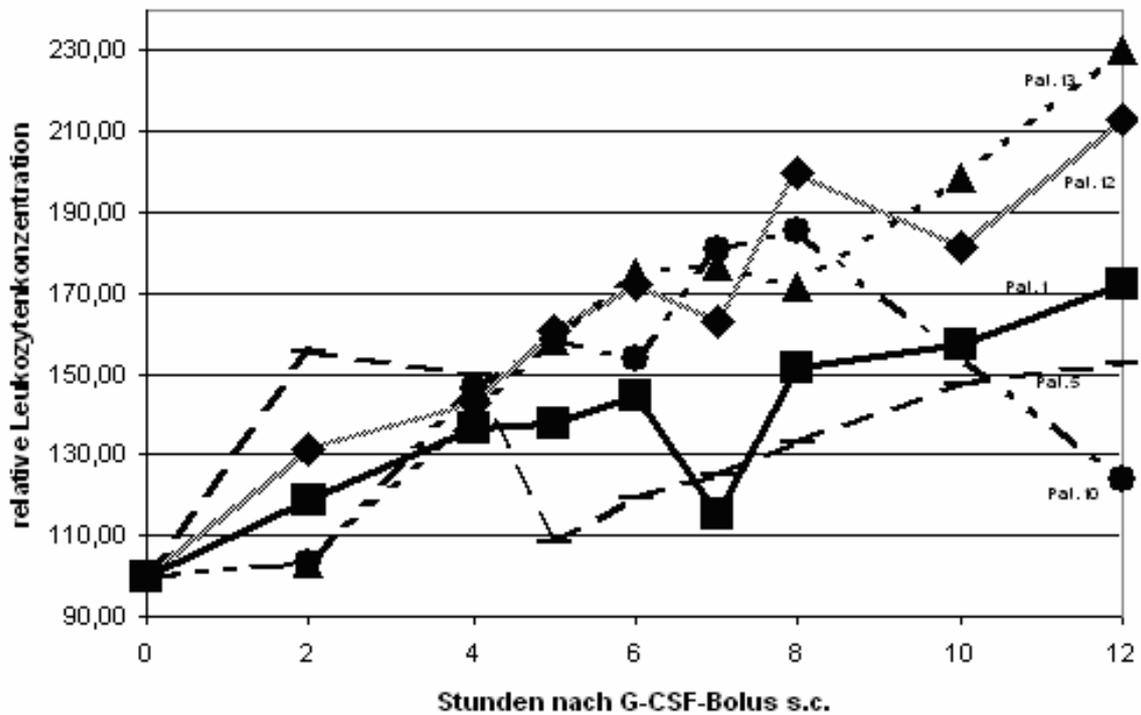


Abb. 3.7 Individuelle Leukozytenkonzentration im venösen Blut bei fünf Patienten, die zunächst einen Anstieg mit Maximum der Leukozytenkonzentration aufweisen, dem sich ein Maximum anschließt, auf das ein weiteres Maximum folgt

3.1.2 Die CD34+Zellkonzentration unter dem Einfluß von G-CSF

Die CD34+ Zellkonzentration im venösen Blut der 14 hier untersuchten Patienten wurde durchflusszytometrisch ermittelt, die Probenaufbereitung erfolgte innerhalb von zwei Stunden nach der Entnahme. So wurden insgesamt 121 Einzelmesswerte bei den 14 Patienten erfasst. Die maximale CD34+ Zellkonzentration lag bei 348 Zellen/ μ l, die minimale bei 8 Zellen/ μ l. Im arithmetischen Mittel betrug die CD34+ Zellkonzentration 86 CD34+ Zellen/ μ l bei einer breiten individuellen Streuung der Werte. Der Median der CD34+ Zellkonzentrationsmessungen lag bei 66 CD34+ Zellen/ μ l

Patient	0	2	4	5	6	7	8	10	Mittel- 12 wert	Stabw	Median	
2	13,24	11,24	10,15	9,87	10,95	14,61	16,18		12,15	2,15	11,24	
10	203,01	204,25	208,03	206,78	225,83	285,66	227,64	242,24	225,43	28,07	216,93	
3	42,34	34,80	22,87	36,36	35,02	31,55	36,21	25,50	16,67	31,26	8,04	34,80
6	81,89	99,15	102,26		80,68	128,76	149,62	121,52	116,00	109,99	23,66	109,13
4	145,67	233,00	286,33	119,67	189,00	146,33	167,67	146,50	112,67	171,87	56,31	146,50
11	21,38	21,44	24,13	24,54	18,36	21,26	18,53		21,06	21,71	2,31	21,32
8	64,94	40,28	65,13	66,22	58,06	65,18	75,24	141,27	112,04	76,48	30,84	65,18
5	7,81	13,40	13,89	10,40	11,22	17,60	17,26	22,39	20,09	14,89	4,79	13,89
9	67,16	79,42	64,71	73,21	58,81	66,78	68,29	96,17	108,44	75,89	16,30	68,29
7	92,40	82,17	74,69	70,13	61,21	72,76	93,40	77,31	65,21	76,59	11,12	74,69
12	42,11	49,81	61,25	63,40	61,63	47,28	77,65	65,19	93,62	62,44	15,88	61,63
1	53,06	61,42	75,65	116,62	89,53	76,64	102,64	91,92	82,17	83,29	19,67	82,17
13	151,18	176,57	229,14	255,14	232,11	256,37	253,46	280,97	348,10	242,56	57,09	253,46
14	14,85	8,37	10,50	18,94	16,99	15,15	18,97	23,01	17,40	16,02	4,47	16,99

Tab. 3.4 Absolute CD34+ Zellkonzentrationen (Individualliste) aller 14 Patienten, aufgetragen gegen die Stunden nach G-CSF-Gabe.

Patient	0	2	4	5	6	7	8	10	Mittel- 12 wert	Stabw	Median	
2	100,00	84,94	76,70	74,54	82,75	110,41	122,23		91,63	18,18	84,94	
10	100,00	100,61	102,48	101,86	111,24	140,71	112,13	119,33	110,35	13,83	106,86	
3	100,00	82,20	54,01	85,88	82,72	74,52	85,54	60,22	39,38	71,31	18,98	82,20
6	100,00	121,07	124,87		98,51	157,22	182,70	148,39	141,65	131,59	28,89	133,26
4	100,00	159,95	196,57	82,15	129,75	100,46	115,10	100,57	77,35	113,04	38,65	100,57
11	100,00	100,31	112,89	114,79	85,88	99,45	58,62		65,76	89,94	20,65	99,72
8	100,00	62,02	100,29	101,97	89,41	100,37	115,86	217,55	172,53	110,60	47,49	100,37
5	100,00	171,71	177,89	133,15	143,68	225,46	221,10	286,76	257,36	181,62	61,32	177,89
9	100,00	118,25	96,36	109,01	87,57	99,43	101,68	143,20	161,47	110,93	24,26	101,68
7	100,00	88,93	80,84	75,90	81,96	78,75	101,08	83,67	70,58	84,09	10,34	81,96
12	100,00	118,29	145,47	150,57	146,37	112,29	184,41	154,81	222,34	144,24	37,71	146,37
1	100,00	115,76	142,58	219,79	168,75	144,44	193,44	173,25	154,87	152,98	37,07	154,87
13	100,00	116,80	151,57	168,77	153,53	169,58	167,66	185,85	230,26	156,34	37,76	167,66
14	100,00	56,32	70,71	127,53	114,40	101,96	127,69	154,92	117,12	103,58	30,12	114,40

Tab. 3.5 Relative CD34+ Zellkonzentrationen (Individualliste), bezogen auf den jeweiligen Ausgangswert (0-Stunden-Wert)

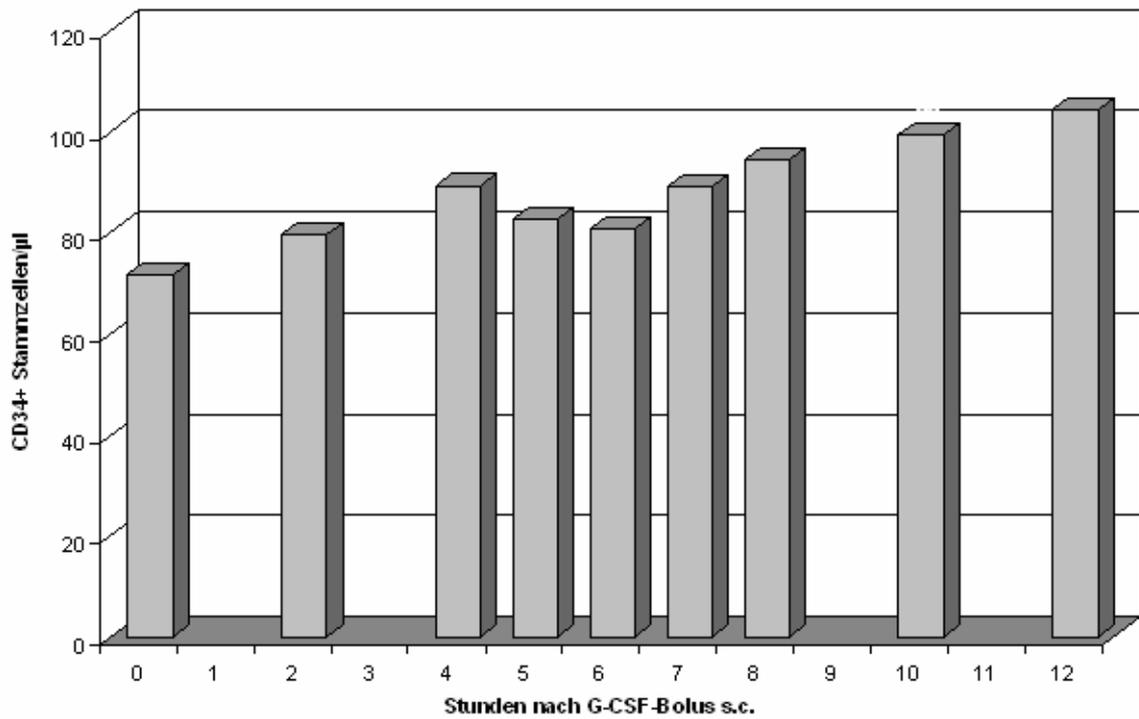


Abb. 3.8 Mittelwerte der absoluten CD34+ Stammzellkonzentration im 12h-Monitoring.

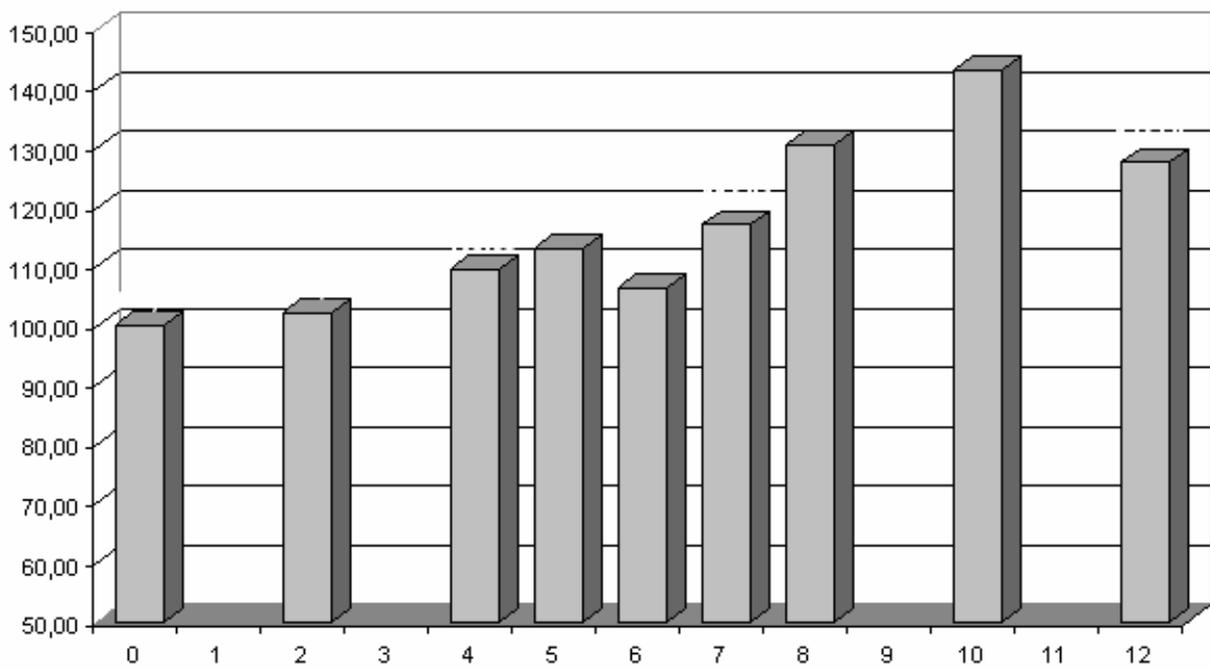


Abb. 3.9 Geometrische Mittelwerte der relativen CD34+ Stammzellkonzentration im 12h-Monitoring.

In der Gesamtbetrachtung der Durchschnitts- bzw. Geometrischen Mittelwerte aller 14 Patienten zeigt sich für den CD34+ Konzentrationsverlauf ein anfänglicher Anstieg der CD34+ Zellkonzentration im Blut der Patienten, der zu einem ersten Maximum um die Stunden 4 und 5 nach G-CSF-Gabe führt. Daraufhin wird ein Einbruch der CD34+ Konzentration beobachtet, der zwar nicht unter den Ausgangswert fällt, jedoch niedriger liegt als der Höchstwert des vorhergehenden Maximums. Nach durchschreiten des Nadirs um Stunde sechs kommt es zu einem erneuten Anstieg der Konzentration zur Stunde 10 nach G-CSF Gabe. Um die Stunden 12 nach G-CSF ist ein erneuter Abfall der CD34+ Zellkonzentration zu verzeichnen.

Bei der Analyse der Konzentrationsänderungen bei den einzelnen Patienten fanden sich insgesamt vier Patienten, deren Ausgangswert der Messung (0-Stunden-Wert) höher lag als der Endwert (12-Stunden-Wert). Bei allen anderen zehn Patienten lag der Endwert der Messung über dem Niveau des Ausgangswertes. Bei einer Patientin überragte der Ausgangswert der Messung alle anderen Messwerte, das absolute Maximum der Messwertreihe entsprach damit dem Ausgangspunkt der Messung.

Bei zehn der vierzehn Patienten (71%) war das absolute Maximum der CD34+ Stammzellkonzentration in einem Zeitraum nach mindestens sieben Stunden nach G-CSF-Bolus s.c. zu finden. Auf alle 14 Patienten bezogen lag das Maximum bei durchschnittlich etwa 8 Stunden.

Das absolute Minimum der CD34+ Zellkonzentration lag im Durchschnitt bei 5 Stunden. Kein individuelles Minimum konnte nach der 8. Stunde des Monitorings festgestellt werden. Bei den Patienten, deren Endwert der Messung den Ausgangswert unterschritt, fand sich ein Minimum der Stammzellkonzentration in den Stunden vier und fünf nach G-CSF-Bolus.

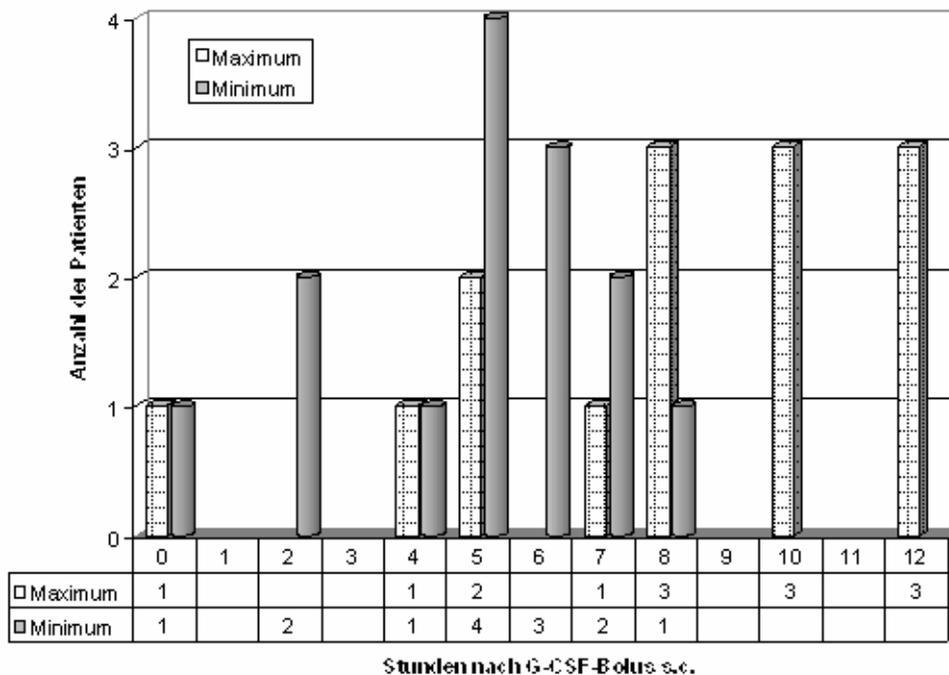


Abb.3.10 Darstellung der Patientenanzahl, die zu einem bestimmten Zeitpunkt ein Maximum oder Minimum ihre CD34+Zellkonzentration im peripheren Blut aufwies. Minimalkonzentrationen waren vor allem zwischen Stunde 5 und Stunde 7 nach G-CSF-Gabe vorhanden, kein Minimum der CD34+ Konzentration war nach Stunden 8 zu messen. Die Maxima der CD34+ Zellkonzentrationen sind vor allem ab Stunde 8 nach G-CSF-Gabe festzustellen.

Die Darstellung der Individualverläufe zeigt im Gegensatz zur Betrachtung der Durchschnittswerte eine Vielfalt von Variationen. Dabei war es aufgrund der kleinen Datenmengen nicht möglich, eine statistisch gesicherte Gruppierung der Patienten entsprechend der Verläufe vorzunehmen.

In allen Fällen konnte mindestens eine maximale CD34+ Zellkonzentration im peripheren Blut nachgewiesen werden, in 50% der Fälle sogar ein weiteres Maximum. In den meisten Fällen (10 von 14, entspricht 71%) wurde mindestens eine Minimalkonzentration von CD34+ Zellen im peripheren Blut nachgewiesen (es lag also kein kontinuierlicher Anstieg vor).

Zudem war es möglich, eine grundsätzliche Aussage über den initialen Verlauf der CD34+ Zellkonzentrationen zu tätigen: nämlich ob dieser einem initialen Anstieg oder Abfall der Stammzellkonzentration nach G-CSF unterlag. Aus den gefundenen Verläufen ergab sich somit die Definition von zwei unterschiedlichen Mobilisierungsverhalten bei den untersuchten Patienten:

Mobilisierungstyp I : Initialer Anstieg der CD34+ Zellkonzentration nach G-CSF-Gabe

Mobilisierungstyp II: Initialer Abfall der CD34+ Zellkonzentration nach G-CSF-Gabe

Werden die Patienten nach diesem Kriterium ausgewertet, zeigen 56% der Patienten (n=9) einen der G-CSF-Applikation unmittelbar folgenden Anstieg der CD34+ Zellkonzentration im venösen Blut, während 36% der Patienten (n=5) einen Abfall der CD34+ Zellkonzentration nach G-CSF-Gabe aufweisen (s. Abb. 3.11 und 3.12). Bei den Patienten, die zunächst einen Abfall der CD34+ Zellen aufwiesen, der Zeitpunkt des erneuten Anstiegs über die Ausgangszellkonzentration im Median bei 6 Stunden nach G-CSF, wobei eine Patientin ihren Ausgangswert im Laufe der Messung nicht mehr erreichte.

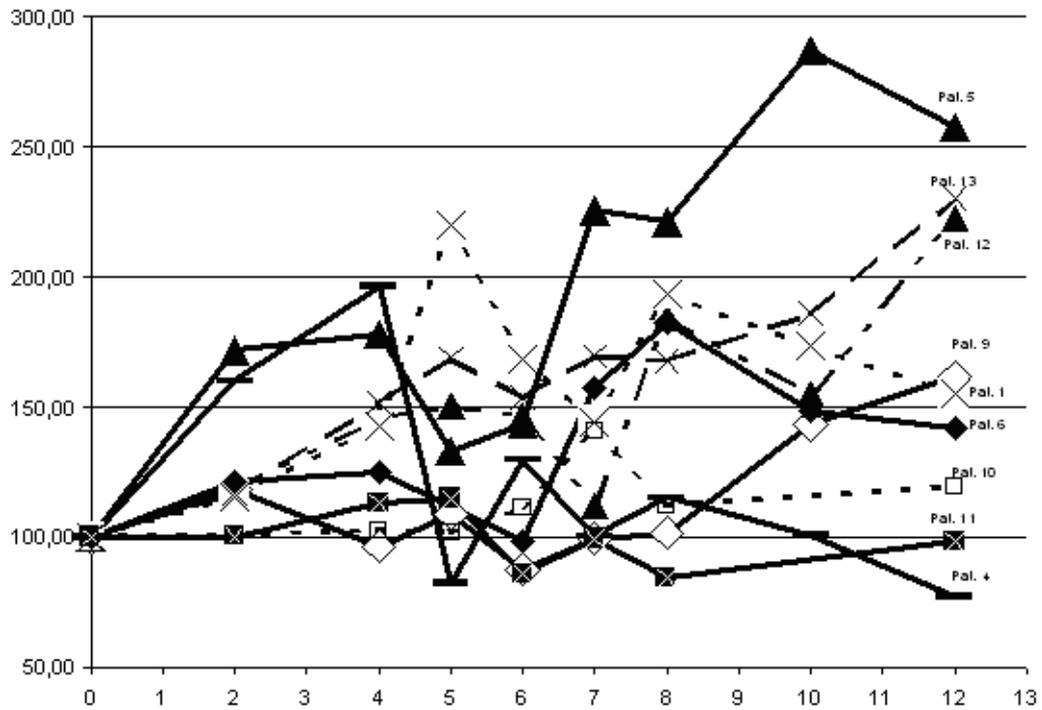


Abb. 3.11 CD34+Zellkonzentrationsverlauf über 12 Stunden: 9 Patienten zeigte einen initialen Anstieg der CD34+ Zellkonzentration (Mobilisierungstyp I).

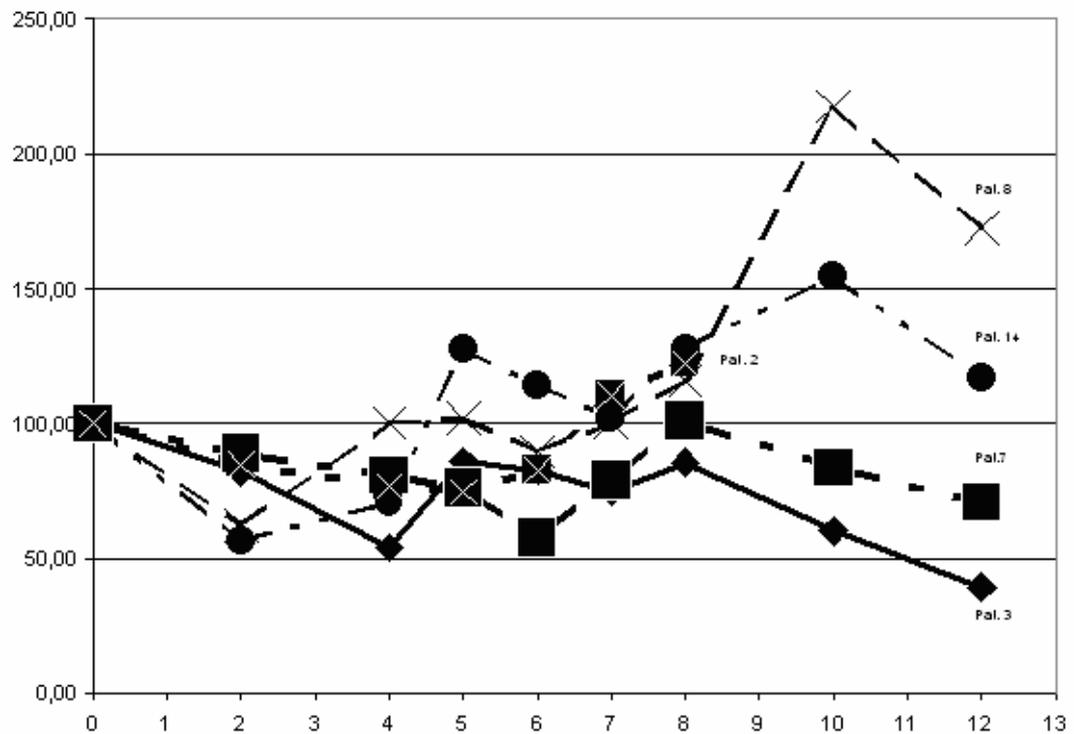


Abb. 3.12 CD34+Zellkonzentrationsverlauf über 12 Stunden: 5 Patienten zeigte einen initialen Abfall der CD34+ Zellkonzentration (Mobilisierungstyp II)

3.1.3 Messung weiterer hämatologischer Parameter

3.1.3.1 Messungen der Erythrozytenkonzentration

Die mittlere Erythrozytenkonzentration der Patienten während des Monitoring betrug 3,01 Mio./ μ l, bei einer Standardabweichung von 0,55 und einem Median von 2,93 Mio./ μ l. Dabei zeigte sich bei einem Grossteil der Patienten ein abfallender Verlauf der Erythrozytenkonzentration. Während nur ein einziger Patient am Ende der Messung eine signifikant höhere Erythrozytenkonzentration aufwies als zu Beginn der Messung (keiner der Messwerte dieses Patienten fiel während der 12 Stunden unter den Ausgangswert), konnten bei den restlichen dreizehn Patienten nur eine Konzentration nahe am Ausgangswert (\pm 5% der Ausgangskonzentration bei 6 Patienten) oder unterhalb des Ausgangswertes erfasst werden (7 Patienten).

Die Erythrozytenkonzentrationen unterlagen vielfach individuellen Schwankungen, die zumeist mindestens einen eindeutigen Maximal- bzw. Minimalwert für den zwölfstündigen Verlauf aufwies. Das Maximum bei zwei Patienten war dabei zur Stunde 0 zu finden, drei weitere eindeutige Maximalwerte fanden sich jeweils zwischen 4 und 6 Stunden nach dem G-CSF- Bolus, und zwischen 10 und 12 Stunden nach G-CSF-Gabe. Die Minimalwerte waren vor allem um die 6. Stunde und um die 12 Stunde nach G-CSF zu finden.

Bei der Betrachtung der geometrischen Mittelwerte für die relativen Erythrozytenkonzentrationen aller vierzehn Patienten konnte zunächst ein Abfall bis Stunde 5, maximal bis zur Stunde 7 nach G-CSF-Bolus beschrieben werden. Dabei handelt es sich jedoch um eine Abweichung von unter 7% des durchschnittlichen Ausgangswertes, was als nicht signifikanter Verlauf einzuordnen ist. Nach einem Anstieg zur Stunde 10 kommt es zum Ende der Messung erneut zu einem Abfall.

3.1.3.2 Messungen der Hämoglobinkonzentration (Hb), des Hämatokrit, des mittleren corpusculären Volumens (MCV), des mittleren corpusculären Hämoglobingehaltes (MCH) und der mittleren corpusculären Hämoglobinkonzentration (MCHC)

Die Hämoglobinkonzentration im peripheren Blut der Patienten korrelierte naturgemäß stark mit der Erythrozytenkonzentration. Insbesondere bei der relativen Darstellung beider Parameter lässt sich ein paralleler Kurvenverlauf der Konzentrationskurven gut erkennen, wobei jedoch der Konzentrationsverlauf an sich nur um wenige Prozent vom jeweiligen Ausgangswert abweicht. Wie bei den Erythrozyten zeigt der Hämoglobinkonzentrationsverlauf ein absolutes Maximum bei der Messung des Ausgangswertes, ein Minimum zur Stunde 7 nach G-CSF, und schließlich ein relatives Maximum zur Stunde 10 nach G-CSF-Gabe.

Entsprechende Verläufe weist auch der Hämatokrit auf, der bei geringfügig größeren Abweichungen vom Ausgangswert ebenfalls einen Maximalwert vor G-CSF-Gabe, ein Minimum um Stunde 7 nach G-CSF-Bolus und ein weiteres Maximum um Stunde 10 aufweist.

Für das mittlere Erythrozytenvolumen (MCV) ergaben sich bei keinem der Patienten Abweichungen, die vom Ausgangswert der Messung um mehr als 1,5% zum positiven oder 2,5% zum negativen tendierten, und damit bei physiologischen

Referenzwerten mit Schwankungen über 15% des Ausgangswertes keine signifikanten Verlaufsschwankungen.

Demgegenüber zeigen der mittlere corpusculäre Hämoglobingehalt (MCH) und die mittlere corpusculäre Hämoglobinkonzentration (MCHC) einen parallelen Verlauf oberhalb der jeweiligen Ausgangswerte mit einem Anstieg bis zur Stunde 6 nach G-CSF-Gabe, einem relativen Minimum (noch immer oberhalb des Ausgangswertes) zur Stunde 8 nach Bolus, sowie einem anschließend erneuten Anstieg.

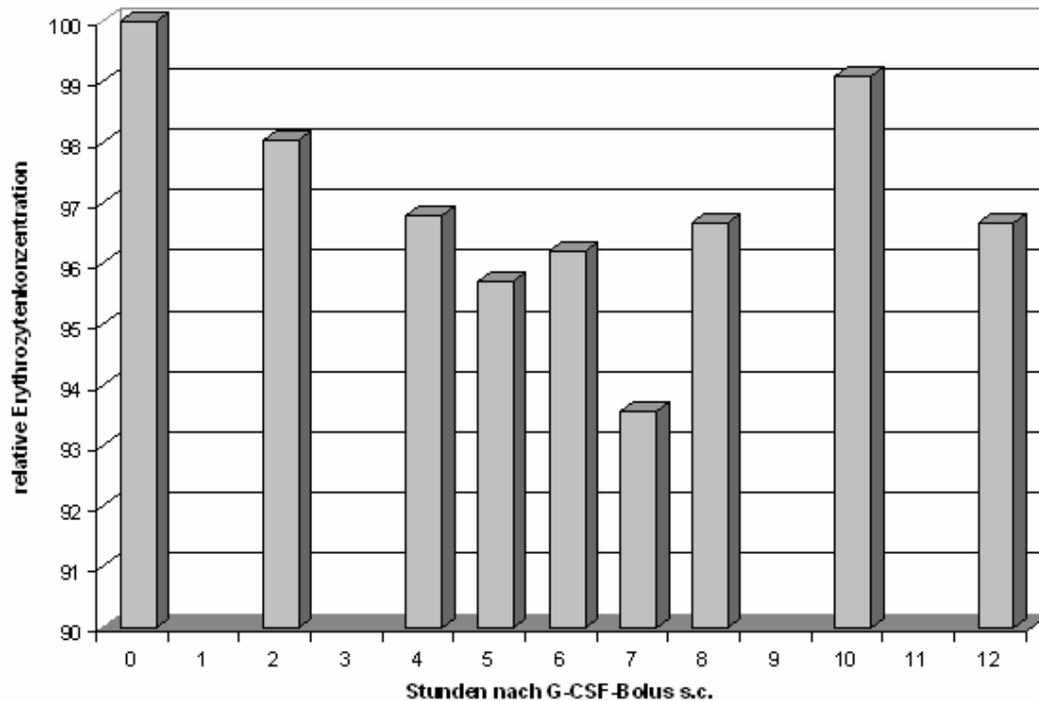


Abb. 3.13 Darstellung des geometrischen Mittels der relativen Erythrozytenkonzentration unter dem Einfluss von G-CSF. Die Änderungen der Erythrozytenkonzentration bleiben unter 7% des Ausgangswertes, zeigen aber ein Minimum um Stunde 7, ein Maximum um Stunde 10 des Monitoring.

Patient	0	2	4	5	6	7	8	10	12	Mittelwert	Stabw	Median
2	2,99	2,72	2,69	3,12	2,72	2,73	2,66			9,58	5,68	2,73
10	4,75	3,97	3,82	3,88	3,75	3,76	3,78		3,62	10,66	7,47	3,82
3	3,36	3,55	3,27	3,26	3,57	3,05	3,08	3,04	3,07	9,77	6,34	3,27
6	2,95	2,96	2,87		2,93	2,86	3,05	3,11	2,96	8,79	5,77	2,96
4	2,57	2,93	3,00		3,10	3,19	3,55	3,64	3,33	39,41	15,67	3,26
11	2,61	2,45	2,41	2,47	2,63	2,61	2,54	2,53	2,48	70,44	24,80	2,54
8	2,77	2,65	2,73	2,64	2,61	2,69	2,78	2,79	2,85	101,17	34,72	2,75
5	3,90	4,44	4,49	3,93	3,87	4,00	3,96	4,01	4,03	131,49	45,65	4,01
9	3,14	2,98	2,95	2,84	2,80	2,98	2,88	2,91	2,91	162,24	54,24	2,93
7	2,92	2,71	2,76	2,72	2,65	2,58	2,63	2,51	2,58	192,95	63,69	2,68
12	2,62	2,56	2,51	2,58	2,58	2,48	2,59	2,51	2,57	223,69	73,29	2,58
1	4,30	4,25	4,15	4,08	4,01	3,17	4,01	3,96	3,99	254,03	84,32	4,05
13	3,01	2,91	2,87	3,14	2,84	2,76	2,77	2,86	2,94	284,64	92,91	2,89
14	2,99	2,72	2,69	3,12	2,72	2,73	2,66			9,58	5,68	2,73

Tab. 3.7 Wertetabelle Erythrozytenkonzentration (absolut, $\cdot 10^6/\mu\text{l}$, Individualliste), bezogen auf Anzahl der Stunden nach G-CSF-Gabe.

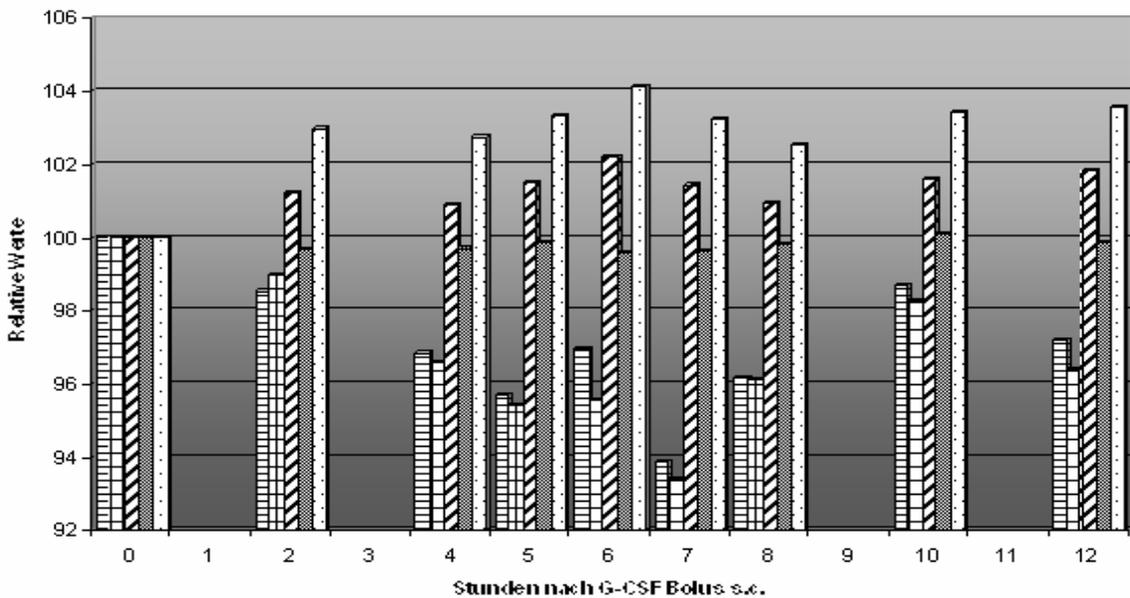


Abb. 3.14 Darstellung der direkt oder indirekt Erythrozyten-abhängigen Parameter unter dem Einfluss von G-CSF. Von links nach rechts zu jedem Messzeitpunkt: Hb, Hkt, MCH, MCV, MCHC.

3.1.4 Messung der Thrombozytenkonzentration

Der Verlauf der Thrombozytenkonzentration unter G-CSF-Einfluss zeigt nach einem Anstieg bis zur Stunde 5 einen anschließenden Abfall mit Rückkehr zu den Werten nahe dem Ausgangswert. Dabei erreichten einzelne Patienten Anstiege um bis zu 100 Prozent im Vergleich zum Ausgangswert, während andere sogar einen Abfall der Konzentration zeigten, der den Ausgangswert im Laufe des Monitoring nicht mehr erreichte. Im Gesamtbild erreichten die Patienten so einen Thrombozytenanstieg von bis zu 20% ihres Ausgangswertes um die Stunde 6 nach G-CSF-Gabe.

Eine Patientin erhielt während des Monitoring, nachdem die Thrombozyten auf einen Wert unter 6000 Thrombozyten/ μ l abgefallen war, ein Thrombozytenkonzentrat infundiert, was zu einer Steigerung der Thrombozyten um den Faktor 5 bezogen auf den Ausgangswert führte. Daher wurde diese Patientin bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

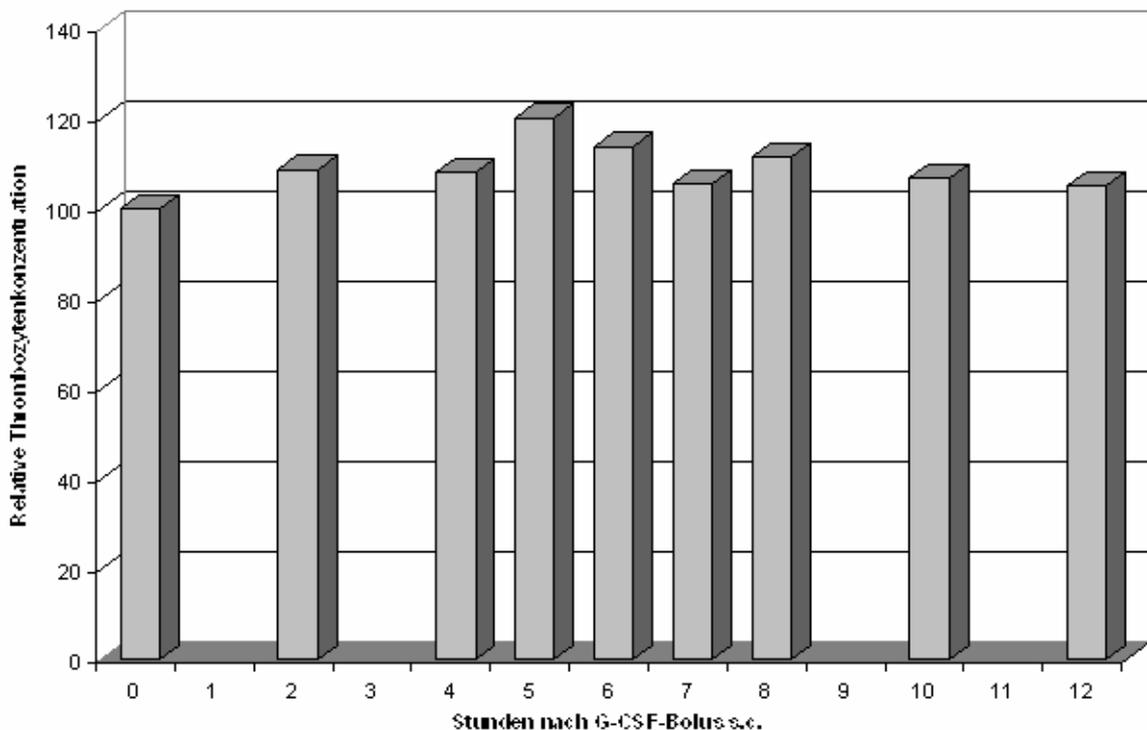


Abb. 3.15 Darstellung der relativen Thrombozytenkonzentration unter dem Einfluss von G-CSF unter Ausschluss von Patientin 2, der wegen einer Thrombozytopenie unter 6000 Thrombozyten/ μ l ein Thrombozytenkonzentrat transfundiert wurde.

3.2 Die CD34+Zellkonzentration unter dem Einfluß von G-CSF und unter Berücksichtigung von Geschlecht und Alter der Patienten

Das bereits weiter oben vorgestellte Patientenkollektiv erlaubt eine weitere Einteilung in Untergruppen, deren Einfluß in Bezug auf die Art der Mobilisierung der Patienten untersucht wurde. Dabei wurden die schon erwähnten Einteilungen vorgenommen in:

Betreffend Geschlecht: männlich weiblich

Betreffend Alter: Kinder < 3 Jahre Kinder 3 - 12 Jahre Kinder >12 Jahre

Geschlecht	w	m	Summe
Altersgruppe 1	3 (1,5,6)	1 (12)	4
Altersgruppe 2	2 (1,7)	3 (10,13,14)	5
Altersgruppe 3	2 (3,4)	3 (8,9,11)	5
Summe	7	7	14

Tab 3.8 Darstellung des Patientenkollektivs nach Altersgruppen und Geschlecht: Anzahl (Patientennummern in Klammern).

3.2.1 Untersuchung bezüglich des Patientengeschlechtes

3.2.1.1 Art des Anstiegs

Für den Verlauf des Konzentrationsanstieges der Leukozyten war kein signifikanter Unterschied in den Verläufen der Leukozyten-Konzentrationen für männliche oder weibliche Patienten nachweisbar (Craddock-Flood-Test: $p=0,91$ bei $\chi^2=0,53$).

	einfacher Leuko-Anstieg	einfaches Maximum	Min-Max	Max-Min	Summe
weiblich	2	1	2	2	7
männlich	1	1	2	3	7
Summe	3	2	4	5	14

Tab 3.9 Auswertung der Art des Leukozytenanstiegs bezogen auf das Geschlecht. Bei einer homogenen Verteilung auf die unterschiedlichen Leukozytenanstiegsmodi konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0,91$)

Wie auch schon für die Leukozytenkonzentration der Patienten aufgezeigt, waren keine signifikanten Zusammenhänge zwischen Geschlecht und Mobilisationstyp der CD34+ Zellen im peripheren Blut der Kinder nachweisbar (Fishers-Exact-Test $p=0,5$).

	I	II	Summe
weiblich	4	3	7
männlich	5	2	7
	9	5	14

Tab 3.10 Auswertung des Verhältnisses: Patientengeschlecht zu Mobilisierungstyp.

3.2.1.2 Zeitpunkt des Maximums/Minimums

Der Zeitpunkt des CD34+ Zellkonzentrationsmaximums bei den pädiatrischen Patienten zeigte eine auffällige Verteilung in Bezug auf das Geschlecht der Patienten: während die weiblichen Patienten nahezu über den gesamten Zeitraum vereinzelt Maxima ihrer CD34+ Zellkonzentration aufwiesen, mit einem Gipfel zur Stunde 8 nach G-CSF-Bolus, zeigten die männlichen Patienten ihre maximalen CD34+ Konzentrationswerte erst später. Kein männlicher Patient konnte ein absolutes Zellmaximum vor der Stunde 5 nach G-CVF vorweisen; zu diesem Zeitpunkt hatten zwei der weiblichen Patienten ihre maximale CD34+ Zellkonzentration bereits durchschritten. Die Konzentration der CD34+Zellen erreichten bei den männlichen Patienten ihr Maximum später.

Dabei erreichten die männlichen Patienten ihre maximale CD34+ Zellkonzentration nach durchschnittlich 9,71 Stunden, die weiblichen Patienten bereits nach 6,14 Stunden, was einer Differenz von 3,57 Stunden entspricht. Die Standardabweichung für die männlichen Patienten betrug 2,75 bei einem Median von 10 Stunden, für die weibliche 3,3 bei einem Median von 8 Stunden.

Für die Verteilung der Minimalkonzentrationen an CD34+ Zellen im peripheren Blut lässt sich kein klarer Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern erkennen, obgleich in der Gruppe der weiblichen Probanden alle Patienten ihr Minimum zwischen Stunde 4 und Stunde 7 aufweisen, während sich die Minimumkonzentrationen bei den männlichen Probanden auf 8 Stunden (von Stunden 0 bis Stunde 8 nach G-CSF-Gabe) verteilen. Im Durchschnitt liegt das Minimum bei den weiblichen Patienten um 5,2 Stunden nach G-CSF-Bolus, bei den männlichen bei etwa 4,4 Stunden nach G-CSF-Bolus, wobei die Standardabweichung bei den Mädchen mit 0,95 Stunden wesentlich geringer ist als die der Jungen (Standardabweichung 3,0 Stunden). Der Median liegt bei den Mädchen bei 5 Stunden, bei den Jungs bei 6 Stunden nach G-CSF.

Auffällig in der Verteilung ist, dass 4 der 7 Patientinnen ein Minimum der CD34+Zellkonzentration um die Stunde 5 nach G-CSF-Gabe aufweisen, und sich die anderen Patientinnen auf die Zeit -1 bis +2 Stunden darum verteilen. Die männlichen Patienten hingegen zeigen die Minima entweder direkt am Anfang der Messung (Stunde 0 bis Stunde 2 nach G-CSF-Bolus) oder am Ende derselben (Stunde 6 bis Stunde 9).

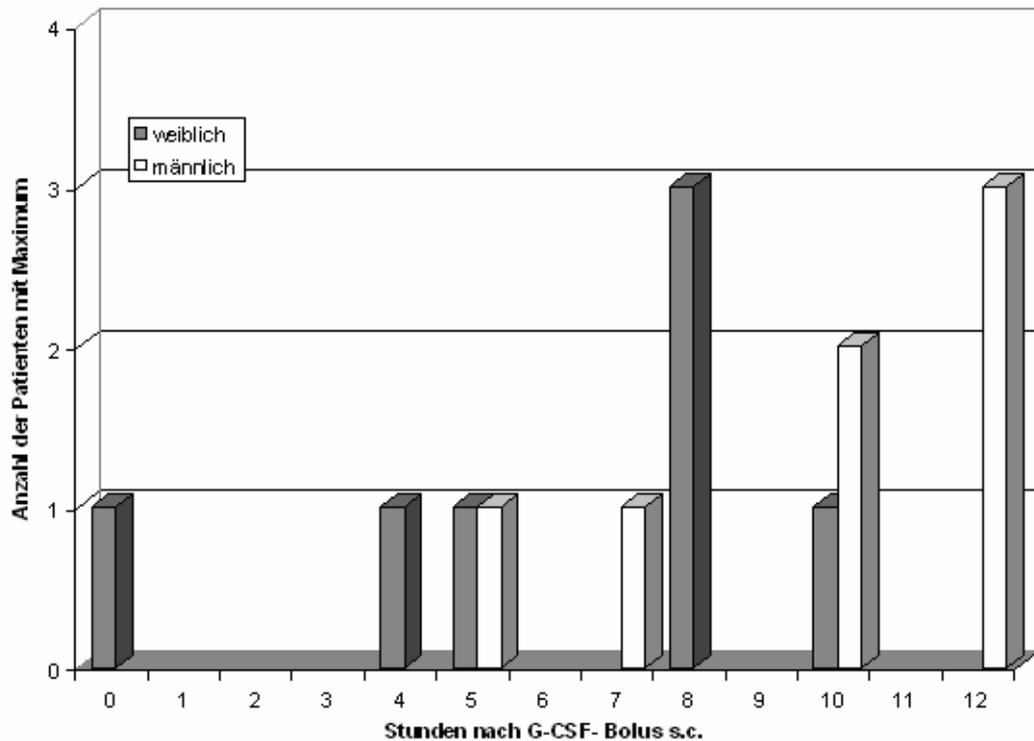


Abb. 3.16 Unterschiedliche Verteilung der maximalen CD34+ Stammzellkonzentrationen im peripheren Blut in Bezug auf das Geschlecht der 14 Patienten. Während alle weiblichen Patienten das absolute Maximum der CD34+ Zellen über den Zeitraum von Stunde 0 bis Stunde 10 aufwiesen, konnte bei den männlichen Patienten eine Maximalkonzentration erst ab Stunde 5 nach G-CSF nachgewiesen werden. Der Median lag für das männliche Kollektiv 2 Stunden nach dem weiblichen (10 h gegenüber 8 Stunden).

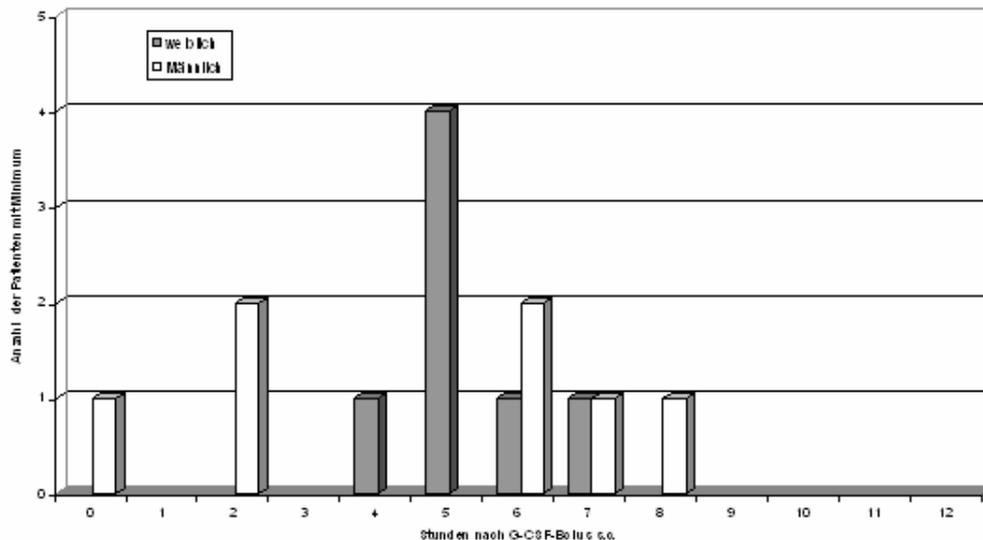


Abb. 3.17 Unterschiedliche Verteilung der minimalen CD34+ Stammzellkonzentrationen im peripheren Blut in Bezug auf das Geschlecht der 14 Patienten. Bei den weiblichen Patienten lagen alle Minimalkonzentrationen innerhalb der Zeitraums 4-7 Stunden nach G-CSF-Gabe, die Männlichen Patienten zeigten Minimalkonzentrationen Von Stunde 0-2 und Stunde 6-8 nach G-CSF-Gabe.

3.2.2 Gruppierung nach Alter

Die Einteilung der Patienten des Kollektivs nach dem Alter entspricht pädiatrischen Vorgaben zum Verständnis der Kindesphysiologie. Dabei wurden drei Altersgruppen gebildet, die wie folgt definiert wurden:

1. Säuglinge und Kleinkinder (ab Geburt bis vollend. 3. Lbj)
2. Kindergarten- und Schulkinder (ab 3. Lbj bis vollendetes 12. Lbj)
3. pubertäre und postpubertäre Kinder (Kinder ab 12. Lbj)

Einteilung:

Altergruppe 1: Pat. Nr.	1, 5, 6, 12	= Summe 4
Altergruppe 2: Pat. Nr.	2, 7, 10, 13, 14	= Summe 5
Altergruppe 3: Pat. Nr.	3, 4, 8, 9, 11	= Summe 5

3.2.2.1 Maximum/Minimum-Untersuchung

Der Craddock-Flood-Test für die Verteilung der Patienten aus den drei Altersgruppen ergab eine nicht-signifikante Verteilung auf die vier Leukozytenanstiegstypen, wobei der p-Wert nach Craddock-Flood nur 0,06 betrug (bei $\chi^2=12$). In der Altersgruppe 1 vollzog sich bei $\frac{3}{4}$ der Patienten der Leukozytenkonzentrationsanstieg nach einem Maximum-Minimum-Muster. In der Altersgruppe zwei hatte keiner der Patienten einen einfachen Leukozytenkonzentrationsanstieg, sondern ausschließlich Maximum-Minimum bzw. Minimum-Maximum-Kombinationen. In der Altersgruppe 3 dagegen war verlief bei 4 der 5 Patienten der Leukozytenanstieg nach einem einfachen Muster (einfacher Anstieg oder einfaches Maximum).

	einfacher Leuko- Anstieg	einfaches Maximum	Min-Max	Max-Min	Summe
1. Altersgruppe	1			3	4
2. Altersgruppe			3	2	5
3. Altersgruppe	2	2	1		5
Summe	3	2	4	5	14

Tab 3.11 Auswertung des Verhältnisses Alter zu Mobilisierungstyp. Obgleich kein signifikanter Zusammen zwischen Altersgruppe und Mobilisierungstyp festgestellt wurde ($p=0,16$, Craddock-Flood-Test), ist die Ausschließliche Mobilisierung von Typ III in Altersgruppe 1 auffällig.

Der Craddock-Flood-Test für die Verteilung der Patienten aus allen drei Altersgruppen auf die CD34+ Mobilisierungstypen I-IV ergab eine nicht-signifikante Verteilung ($p=0,16$ bei $\text{Chi}^2=3,5467$).

Alter/Mobilisierungstyp	I	II	Summe
1. Altersgruppe	4	0	4
2. Altersgruppe	2	3	5
3. Altersgruppe	3	2	5
Summe	9	5	14

Tab 3.12 Auswertung des Verhältnisses Alter zu Mobilisierungstyp. Obgleich kein signifikanter Zusammen zwischen Altersgruppe und Mobilisierungstyp festgestellt wurde ($p=0,16$, Craddock-Flood-Test), ist die Ausschließliche Mobilisierung von Typ I in Altergruppe 1 auffällig.

Demgegenüber fiel auf, dass alle Kinder der Altersgruppe 1 (1x männlich , 3x weiblich), der Mobilisierung nach Typ I zuzuordnen waren. Bei Überprüfung der Subpopulationen Altersgruppe I gegen Restkollektiv auf die Mobilisierung vom Typ 1 konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Fishers-Exact-Test: $p=0,07$ bei $\text{Chi}^2=3,1$). Somit lassen sich für die drei Altersgruppen keine eindeutigen Häufung oder Zuordnung zu einem der Mobilisierungstypen nachweisen, jedoch darf auf eine interessante Verteilung des Mobilisierungstyps I in der jüngsten Altersgruppe hingewiesen werden.

3.3 Die CD34+Zellkonzentration unter dem Einfluß von G-CSF und unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Tumorerkrankungen

Abgesehen von den bisher aufgeführten Analysen lassen sich auch die Erkrankungen der Patienten auf eine Koinzidenz, einen Zusammenhang oder eine Abhängigkeit prüfen. Dazu kann das Kollektiv der Patienten zum einen in Gruppen mit Einzelkrankheiten aufgeteilt werden, zum anderen kann für Vier-Felder-Tafel-Analysen das Kollektiv der Patienten in Neuroblastom- und Nicht-Neuroblastom-Patienten aufgeteilt und auf unterschiedliche Parameter hin untersucht.

Als Grundlage für die Berechnung der Vier-Felder-Tafeln wurde der Craddock-Flood-Test verwendet, da dieser auch kleine Fallzahlen berücksichtigt, sonst aber dem bekannten χ^2 -Vierfeldertest entspricht.

3.3.1 Craddock-Flood-Test zum Vergleich des Leukozytenanstiegs bei Neuroblastompatienten und anderen Tumoren

Die Berechnung mit Hilfe des Craddock-Flood-Tests erbrachte keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der unterschiedlichen Leukozytenanstiegsarten auf die Neuroblastom- bzw. Nicht-Neuroblastompatienten ($p=0,18$ bei χ^2 4,94). Während bei beiden Osteosarkompatienten ein einfacher Leukozytenanstieg nachgewiesen wurde, zeigte keiner der Neuroblastompatienten einen Leukozytenverlauf mit einfachem Maximum.

	Einfacher Leuko-Anstieg	Einfaches Maximum	Min-Max	Max-Min	Summe
Neuroblastom	1	0	3	4	8
Andere Tumoren	2	2	1	1	6
Summe	3	2	4	5	14

Tab 3.13. Gegenüberstellung der Neuroblastompatienten vs. andere Tumoren, bezogen auf den Verlauf des Leukozytenanstiegs. Im Craddock-Flood-Test kein signifikanter Zusammenhang feststellbar ($p=0,18$).

3.3.2 Craddock-Flood-Test zum Vergleich des CD34+ Zellanstiegs bei Neuroblastompatienten und anderen Tumoren

Die Analyse des vorliegenden Datenmaterials zeigt nach Berechnung des Craddock-Flood-Test, dass es für keiner die Mobilisierungstypen I und II zu einer signifikanten Betonung der Neuroblastomtumoren kommt ($p=0,87$ bei $\chi^2=0,026$).

Tumor/ Mobilisierungstyp	I	II	Summe
Neuroblastom	5	3	8
Andere Tumoren	4	2	6
Summe	9	5	14

Tab 3.14. Gegenüberstellung der Neuroblastompatienten vs. andere Tumoren, bezogen auf den Mobilisierungstyp. Im Craddock-Flood-Test kein signifikanter Zusammenhang feststellbar ($p=0,87$).

3.3.3 Untersuchung der Mobilisierungstypen I und II

Die Verteilung der Patienten auf die Mobilisationstypen ergab, dass sich der Verlauf der CD34+Zellkonzentration für fünf von acht Neuroblastom-Fälle durch einen Graphen von Typ I darstellen lässt. Die beiden Osteosarkompatienten weisen mit der Zuordnung zum Mobilisierungstypen I einen initialen Anstieg der CD34+ Zellkonzentration auf.

Mobilisierungstyp	I	II
Anzahl Patienten	9	5
Relative Verteilung	64%	36%
Erkrankungen	B-Zell-Lymphom 2x Osteoblastom 5x Neuroblastom Ewing-Sarkom	3x Neuroblastom RMS Ewingsarkom
Patienten	2,4,5,6,9, 10,11,12,13,	1, 3, 7, 8,14

Tab 3.15. Zusammenstellung der den Mobilisierungstypen zugeordneten Patienten, deren Krankheiten und die relative und absolute Verteilung.

3.3.4 Untersuchung der CD34+ Zellmobilisation auf absoluten Maxima und Minima

Die zeitliche Verteilung der maximalen CD34+ Konzentrationen (absolute Maxima) ergab für die nicht-Neuroblastompatienten eine nahezu gleichmäßige Verteilung über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg. Sowohl Patienten mit dem Maximalwert als Ausgangswert, als auch solche mit der Maximalkonzentration als Endwert des Monitoring konnten bei den Nicht-Neuroblastompatienten beobachtet werden.

Im Durchschnitt zeigte sich bei diesen Patienten ein absolutes Stammzell-Konzentrationsmaximum im peripheren Blut 6,3 Stunden nach G-CSF-Bolus.s.c. Demgegenüber zeigt sich in der Gruppe der Neuroblastompatienten ein deutlicher Trend zu einem späteren Maximum der CD34+ Zellen im peripheren Blut. Im Durchschnitt kam es hier fast 3 Stunden später als bei der vorher genannten Gruppe, nämlich 9,125 Stunden nach G-CSF-Bolus, zu einer Maximalkonzentration der CD34+ Zellen. Zudem konnte hier keine breite Streuung über den gesamten

Monitoringzeitraum festgestellt werden; vielmehr zeigten 7 der 8 Patienten ihr Maximum ab der 8. Stunde nach G-CSF, nur bei einem Patient konnte das Maximum für die 5. Stunden nach G-CSF-Bolus notiert werden.

Bei den absoluten Minimalkonzentrationen der CD34+ Konzentrationen zeigten sich hingegen keine solch starken Abweichungen des Zeitpunktes nach G-CSF-Gabe bei den beiden Vergleichsgruppen. Während das absolute Minimum der CD34+ Zellen im peripheren Blut bei den Neuroblastompatienten im Durchschnitt nach 6,6 Stunden eintrat, durchschritt die CD34+Konzentration ihr Minimum bei den Nicht-Neuroblastompatienten im Durchschnitt etwa eine Stunde früher, namentlich 5,6 Stunden nach G-CSF-Gabe.

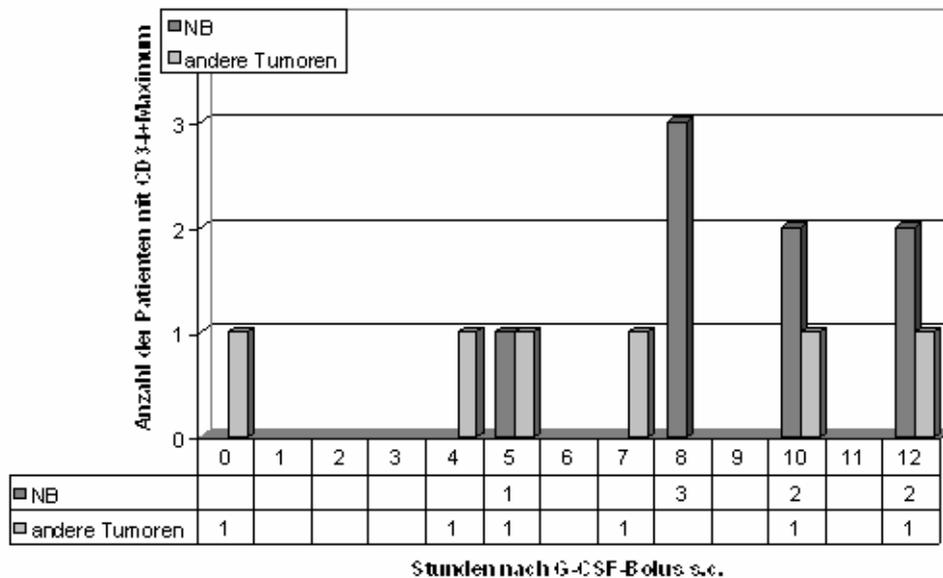


Abb. 3.18.

Übersichtsgrafik über die Verteilung der maximalen CD34+ Zellkonzentrationen über den Beobachtungszeitraum von 12 h. Die Balken geben die Anzahl der Patienten an, die zu einem Messzeitpunkt ihr absolutes CD34+ Zellkonzentrationsmaximum erreicht hatten. Ersichtlich ist eine Verteilung der Maxima bei den Neuroblastompatienten v.a. in der zweiten Monitoring-Hälfte, während sich in der Gruppe der sonstigen Tumoren die Maxima über den gesamten Beobachtungszeitraum verteilen.

Entgegen den Beobachtungen für die maximalen Konzentrationen zeichnete sich bei den Minima für die Neuroblastompatienten keine besondere Zeitliche Verteilung über Zeitraum des Monitoring ab.

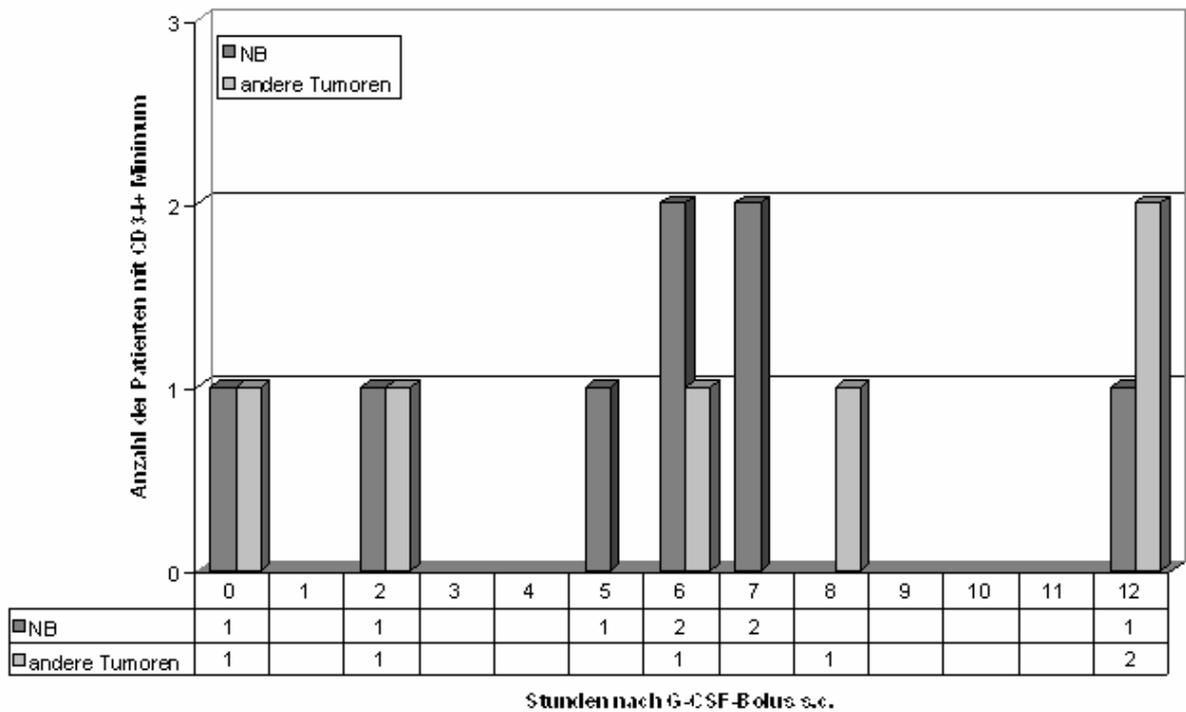


Abb. 3.19. Übersichtsgrafik über die Verteilung der minimalen CD34+ Zellkonzentrationen über den Beobachtungszeitraum von 12 h. Die Balken geben die Anzahl der Patienten an, die zu einem Messzeitpunkt ihr absolutes CD34+ Zellkonzentrationsminimum erreicht hatten.

3.4 Die CD34+Zellkonzentration unter dem Einfluß von G-CSF und unter Berücksichtigung von Mobilisierungsdauer und G-CSF-Dosis

3.4.1 Untersuchung bezüglich der Mobilisierungsdauer in Tagen

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Mobilisierungsdauer und Leukozytenkonzentrationsanstieg ist kein signifikanter Zusammenhang zwischen Art des Leukozytenanstiegs und Mobilisierungsdauer nachweisbar. Der einfache Leukozytenanstieg bzw. das einfache Leukozytenmaximum zeigen sich bei Patienten, die im Median 6 bzw. 7 Tage zuvor mit G-CSF stimuliert wurden. Die komplexeren Verlaufsmuster der Leukozytenkonzentration hingegen traten vor allem bei Patienten mit längerer Stimulation auf 9-12 Tage. Wenn die beiden einfachen Leukozytenkonzentrationsverläufe und die beiden komplexen Verläufe jeweils zusammengefasst werden, berechnet sich für die einfachen Verläufe ein Median bei 6, für die komplexen ein Median von 10 (s.a. Tab 3.16).

	Stimulation- stage (d)	Mittel- wert	Standard- Abweichung	Median
Einfacher Leukozytenanstieg	10	8	2,6	6
	5			
Einfaches Leukozytenmaximum	9	7	2,8	7
	5			
Min-Max	7	13,25	6,5	12
	14			
Max-Min	10	11,4	4,3	9
	22			
	17			
	15			
	9			
	8			
	8			

Tab 3.16 Gegenüberstellung der G-CSF-Stimulationstage und der unterschiedlichen Arten der Leukozytenanstiege. Aufgetragen wurden gegen die Art des Leukozytenkonzentrationsverlaufs die Anzahl der Stimulationstage mit G-CSF (für jeden einzelnen Patienten), der Mittelwert, die Standardabweichung und der Median für alle Patienten, die den jeweiligen Leukozytenkonzentrationsverlauf zeigten. Zusammengefasst erscheinen die Patienten, die eine kürzere Stimulation bis zum Monitoring benötigten, eher einen einfachen Leukozytenverlauf aufzuweisen. Bei den komplexen Verläufen waren im Median längere Stimulationszeiten zu vermerken.

Für die CD34+ Mobilisierungstypen ist ebenfalls kein Zusammenhang zwischen Mobilisierungstyp und Mobilisierungsdauer herzustellen. Die Mediane für alle 4 Typen liegen zwischen 9 und 10,5 (s.a. Tab. 3.17). Auch eine direkte Korrelationsberechnung für einen möglichen Zusammenhang zwischen maximalem CD34+ Wert und Anzahl der Stimulationstage ergibt mit einem Korrelationskoeffizienten von $-0,23$ in der Pearson-Korrelation keinen signifikanten Zusammenhang (Bestimmtheitsmaß $r^2 = 0,05$, Überschreitungswahrscheinlichkeit $p = 0,41$).

Mobilisierungstyp	Stimulationstage (d)	Mittelwert	Standard-Abweichung	Median
I	17	10	3,7	9
	10			
	15			
	5			
	9			
	8			
	8			
	9			
	9			
II	5	11	6,7	10
	10			
	22			
	7			
	14			

Tab 3.17 Gegenüberstellung der G-CSF-Stimulationstage und der Mobilisierungstypen I und II. Aufgetragen wurden gegen den Mobilisierungstyp die Anzahl der Stimulationstage mit G-CSF (für jeden einzelnen Patienten), der Mittelwert, die Standardabweichung und der Median für alle Patienten, die den jeweiligen Mobilisierungstyp aufwiesen. Es lassen sich anhand der Mediane und unter Berücksichtigung der Standardabweichungen keine signifikanten Tendenzen bezüglich eines Zusammenhangs von Mobilisierungsdauer und Mobilisierungstyp nachweisen.

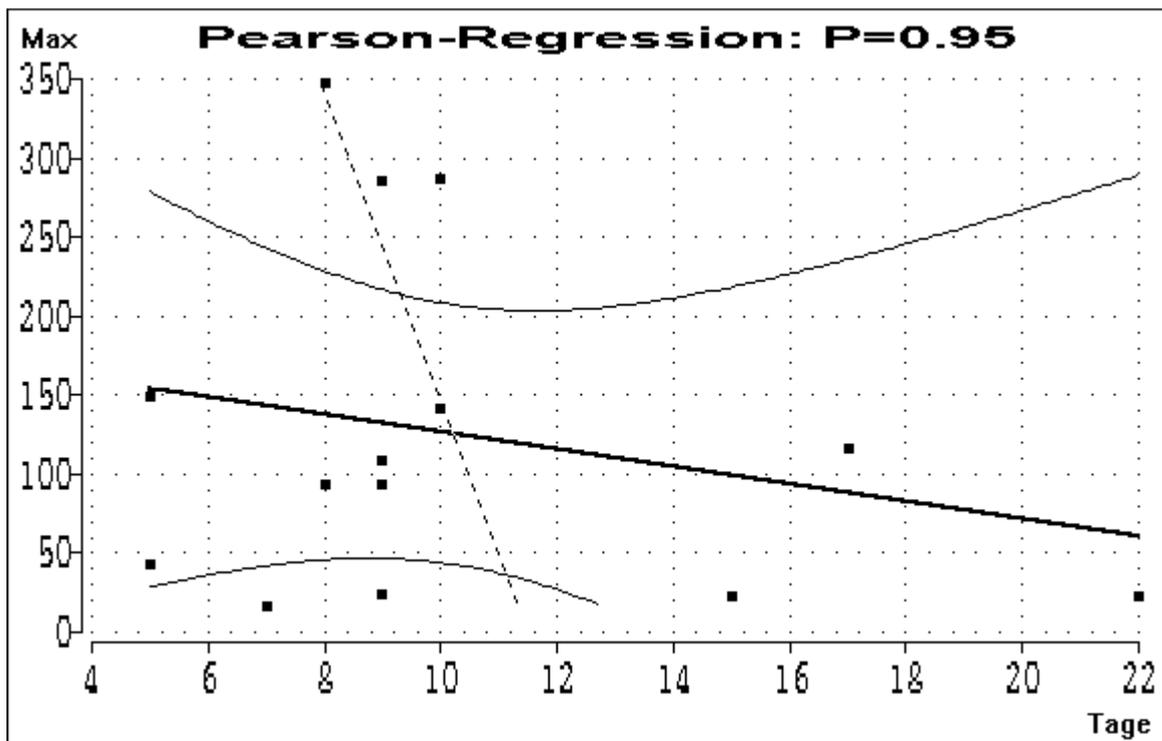


Abb. 3.20 Darstellung der Pearson-Regressionsgrade für das Konfidenzintervall von $p=0.95$. Durchgezogene Linie: Maximum in Abhängigkeit von Tagen; Gestrichelte Linie: Gegenprobe. Hyperbeln: Eingrenzung des Konfidenzintervalls auf $p=0.95$. Keine signifikante Abhängigkeit der beiden Variablen feststellbar.

3.4.1 Untersuchung bezüglich der G-CSF-Dosis pro Kilogramm Körpergewicht und Tag

Bezüglich des Verlaufs der Leukozytenanstiege sind keine signifikanten Unterschiede bei den verschiedenen G-CSF-Dosen feststellbar. Es ist jedoch bei Patienten mit G-CSF-Dosis $>7,9 \mu\text{g/kgKG/d}$ (Median 9,8 bei 3 von 5 Patienten) zumeist einem einfachen Leukozytenanstieg messbar, während G-CSF-Dosen unter $8 \mu\text{g/kgKG/d}$ in keinem Fall zu einem solchen Verlauf geführt haben.

	G-CSF-Dosis/kgKG/d	Mittelwert	Standardabweichung	Median
Einfacher Leukozytenanstieg	10	9,2	1,1	9,8
	9,8			
	8			
Einfaches Leukozytenmaximum	7	6,9	0,1	6,9
	6,8			
	8,3			
Min-Max	4,8	6,7	1,6	6,8
	7,8			
	5,9			
	10,2			
	6,9			
Max-Min	6,7	7,1	1,7	6,7
	5,9			
	5,9			
	5,9			

Tab 3.21 Gegenüberstellung der G-CSF-Dosis/kgKG/d und der unterschiedlichen Arten der Leukozytenanstiege. Aufgetragen wurden gegen die Art des Leukozytenkonzentrationsverlaufs die G-CSF-Dosis/kgKG/d (für jeden einzelnen Patienten), der Mittelwert, die Standardabweichung und der Median für alle Patienten, die den jeweiligen Leukozytenkonzentrationsverlauf zeigten. Bei Patienten mit einem einfachen Leukozytenanstieg liegt der Median um $3 \mu\text{g/kgKG/d}$ höher als bei den anderen Leukozytenkonzentrationsverläufen. Nur zwei Patienten mit einem Wert im Bereich zwischen $8 \mu\text{g/kgKG/d}$ und $10 \mu\text{g/kgKG/d}$ werden nicht der Gruppe „einfacher Leukozytenanstieg“ zugeordnet.

Ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang bestand zwischen der applizierten G-CSF-Dosis/kgKG/d und dem Mobilisierungstyp für die CD34+ Zellkonzentration. Die Mediane für alle Patienten der Mobilisierungstypen lagen mit 7,7 und 6,7 dicht beieinander. Des Weiteren ergab die Pearson-Korrelation für den Zusammenhang Dosis zu der maximalen CD34+ Zellkonzentration während des Monitoring einen Korrelationskoeffizienten von $r=0,01$ (bei Bestimmtheitsmaß $r^2 = 0,0001$ und Überschreitungswahrscheinlichkeit $p=0,97$).

Mobilisierungstyp	G-CSF-Dosis/kgKG/d	Mittelwert	Standard-Abweichung	Median
I	10,2	7,7	1,8	6,9
	10			
	6,9			
	9,8			
	6,8			
	5,9			
	5,4			
	6,7			
	8			
	7			
II	7	6,7	1,4	7
	7,8			
	5,9			
	8,3			
	4,8			

Tab 3.17 Gegenüberstellung der G-CSF-Dosis/kgKG/d und der unterschiedlichen Arten der Mobilisierungstypen. Aufgetragen wurden gegen die Mobilisierungstypen I und II die G-CSF-Dosis/kgKG/d (für jeden einzelnen Patienten), der Mittelwert, die Standardabweichung und der Median für alle Patienten, die den jeweiligen Mobilisierungstyp aufwiesen.

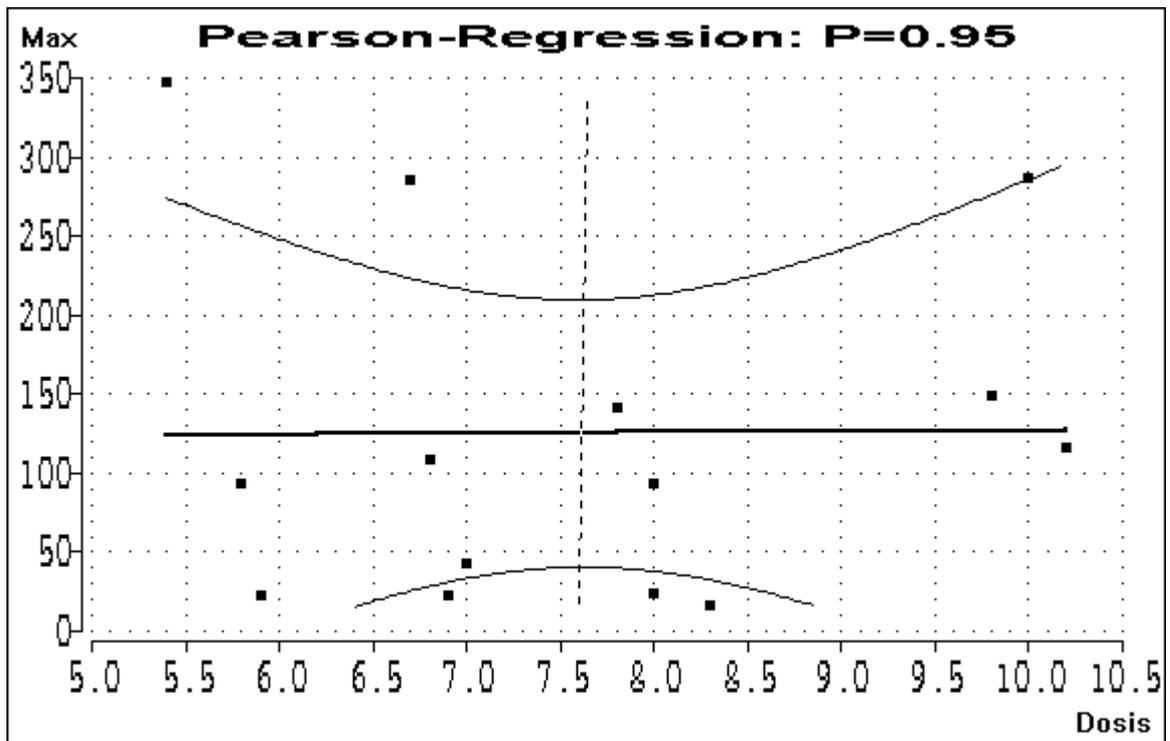


Abb. 3.21 Darstellung der Pearson-Regressionsgrade für das Konfidenzintervall von $p=0.95$. Durchgezogene Linie: Maximum in Abhängigkeit von der G-CSF-Dosis/kgKG/d; Gestrichelte Linie: Gegenprobe. Hyperbeln: Eingrenzung des Konfidenzintervalls auf $p=0.95$. Keine signifikante Abhängigkeit der beiden Variablen feststellbar.

3.5 Zusammenfassende Beantwortung der Fragestellungen , Teil 1

Zu Frage 1:

Welche Verläufe der CD34+ Zellkonzentration unter G-CSF-Stimulation weisen die pädiatrischen Patienten auf, und zu welchem Zeitpunkt ist eine optimale Aphereseausbeute zu erwarten?

Die Verläufe der CD34+ Zellkonzentrationen in den untersuchten Patienten weisen in ihrem Verlauf augenscheinliche individuelle Unterschiede auf. Insgesamt lassen sich die Patienten jedoch in zwei Gruppen teilen, welche sich durch den initialen Anstieg oder Abfall der CD34+ Zellkonzentration unterscheiden. Deutlich unterschieden werden können minimale und maximale CD34+ Zellkonzentrationen bei den hier untersuchten Patienten, ein Hinweis also darauf, dass ein optimaler Apheresezeitpunkt durch ein engmaschiges Stammzellmonitoring auffindbar sein könnte. Aus der Auswertung aller Patientenmessdaten ergibt sich, dass im Durchschnitt ein Maximum für CD34+ Zellen im peripheren Blut der untersuchten Patienten ca. 8 Stunden nach G-CSF-Gabe zu erwarten gewesen ist, dies also als optimaler Zeitpunkt der Apherese gelten darf.

Zu Frage 2:

Kann der Verlauf der Stammzellmobilisierung auch durch Erfassung andere hämatopoetischer Parameter (z.B. der Leukozytenzahl) erfasst werden, und so aufwändige Bestimmungsverfahren vermieden werden?

Der Mobilisierungsverlauf vor einer Leukapherese wird am genauesten durch die Messung der CD34+ Zellkonzentrationen im peripheren Blut erfasst. Die Messung der Gesamtleukozytenzahlen oder bestimmter Subpopulationen erwies sich für die hier durchgeführten Messungen als Unzureichend. Im Gegenteil: die Entwicklung der Gesamtleukozytenkonzentration - über 12 Stunden hinweg betrachtet – differiert so stark von jener der CD34+ Kinetik, dass eine Orientierung an den Leukozytenzahlen zur Apherese zu einem ungünstigen Zeitpunkt führen kann. Deutlich kann die Differenz der beiden Kinetiken im Vergleich in Abbildung 3.22 gesehen werden. Nach einer anfänglichen Parallelität ergeben sich ab Stunde 4 nach G-CSF Differenzen im Verlauf der beiden Parameter in Form von unterschiedlich starken Anstiegen und gegenläufigen Entwicklungen.

Auch andere hier erfasste hämatologische Parameter konnten für die hier vorgestellten Patienten keine hinreichende Aussage über den Mobilisierungsverlauf geben.

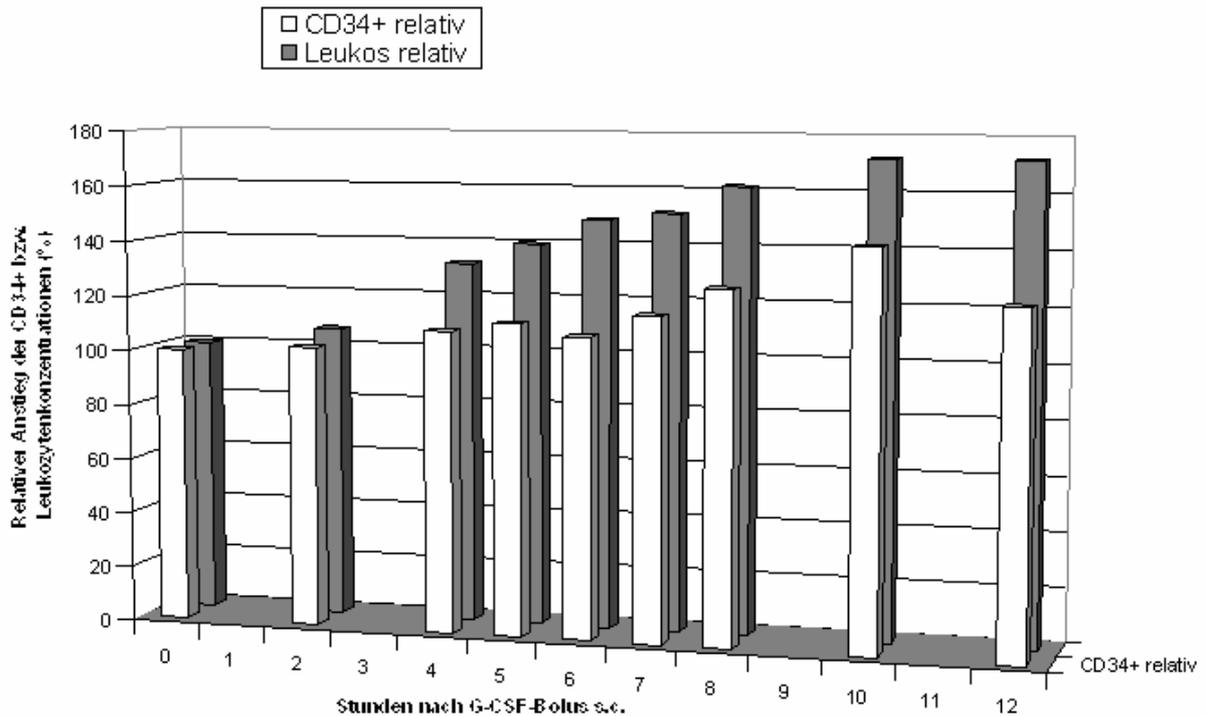


Abb 3.22 Verlauf der relativen CD34+ (vorne) und Leukozytenkonzentrationen (hinten) bei 14 pädiatrischen Patienten unter dem Einfluß von G-CSF; vergleichende Darstellung. Deutlich sind die Abweichungen der beiden Meßreihen im Konzentrationsverlauf insbesondere zur Stunde 6 und Stunde 12 nach G-CSF-Bolus zu erkennen. Dem jeweiligen weiteren Anstieg bzw. Plateau der Leukozytenkonzentration im peripheren Blut steht ein Plateau bzw. Abfall der CD34+ Konzentration entgegen.

In Abbildung 3.23 sind nochmals CD34+ Zellkonzentrationen gegen Leukozytenkonzentrationen aufgetragen. Die Maximalen CD34+ Zellkonzentrationen werden dabei im Bereich zwischen 10000 bis 19000 Leukozyten/ μ l erreicht, wenngleich der Mittelwert der CD 34+ Zellkonzentration tendenziell mit steigender Leukozytenzahl ansteigt. Ein Plateau dieses CD34+ Zellkonzentrationsmittelwertes ist im Bereich von 10000 bis 39000 Leukozyten/ μ l darstellbar.

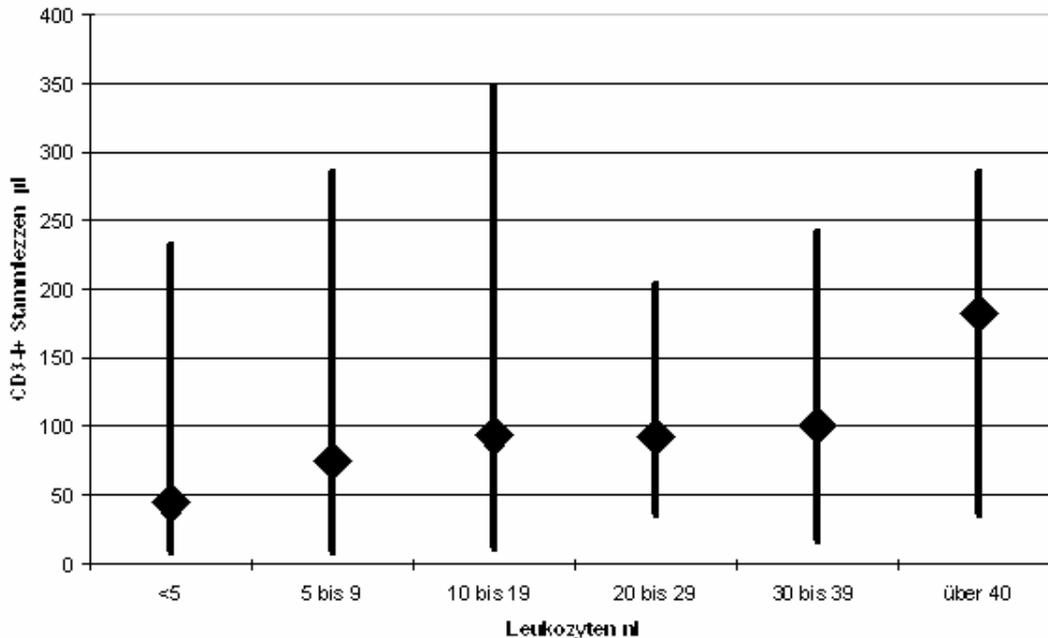


Abb. 3.23 Aufteilung der Konzentrationen der CD34+ Stammzellen aus den Einzelmessungen gegen die Kohorten der Leukozytenkonzentrationen. Die ausgefüllten Kästen repräsentieren den Mittelwert der CD34+ Konzentration im peripheren Blut, die schwarzen Balken beschreiben die Spannweite der Messwerte von der minimalen zur maximalen Konzentration. Auffällig ist, dass die Anordnung der maximalen CD34 Zellen/µl nicht der Anordnung der maximalen Leukozytenkonzentration entspricht: Der CD34+ Zellkonzentrationsmaximum liegt bei 10000 bis 19000 Leukozyten/µl, und eben nicht im Messbereich über 40000 Leukozyten/µl.

Zu Frage 3:

Welche Zusammenhänge zwischen dem Verlauf der CD34+ Zellmobilisierung und Patientenparametern können nachgewiesen werden?

Ogleich aufgrund der geringen Patientenzahlen keine statistisch relevanten Unterschiede der Mobilisierung unterschiedlicher Tumoren nachzuweisen waren, deuten die Daten auf eine eher verzögerte Mobilisierung der Patienten mit Neuroblastom hin. Entgegen der sonstigen Studienlage zeigen sich auch geschlechtsbezogene Unterschiede in der Mobilisierung, die etwas früheren Maximalwerten bei weiblichen Patienten hinweisen. Konform mit früher durchgeführten Untersuchungen zeigen sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Alter des Patienten und der Mobilisierungsart, auffällig erscheint jedoch das ausschließliche Auftreten von Mobilisierungstyp I bei den Patienten bis 3 Jahre. Zusammenhänge zwischen Modus und Durchführung der Mobilisierung sowie CD34+ Zellkonzentrationsverlauf wurden, bei entsprechenden Literaturvorgaben, nicht aufgezeigt. Somit kann die Frage nach den Verlauf beeinflussenden

patientenabhängigen Parametern – trotz Hinweise auf Tumor- und altersbedingte Differenzen - letztlich bei den geringen Patientenzahl nicht abschließend beantwortet werden.

4. Diskussion

4.1 Optimierung des Apheresezeitpunktes

4.1.1 CD34+ Zellkonzentrationsverläufe

Die hier vorgelegte Studie über die Pharmakodynamik von nicht-glykosyliertem G-CSF bei 14 pädiatrisch-onkologischen Patienten hat gezeigt, dass mit Hilfe eines Monitoring der CD34+ Zellkonzentration im peripheren Blut eine Aussage über die Optimierung des Apheresezeitraumes gemacht werden kann. Dabei ergab sich ein von Alter, Tumorart und Geschlecht weitgehend unabhängiger, jedoch für jeden Patienten individuell vorliegender optimaler Apheresezeitraum, der im Durchschnitt bei 8 Stunden nach dem subcutanen G-CSF-Bolus lag.

10 der 14 Patienten wiesen das absolute Maximum an CD34+ Zellen nach der Stunde 7 nach G-CSF-Gabe auf. Die Minimalkonzentrationen an CD34+ Zellen im peripheren Blut wurden im Durchschnitt zwischen der 4. und 6. Stunde nach G-CSF gefunden. Kein Minimum fand sich jenseits der 8. Stunde nach G-CSF-Bolus. Früher durchgeführte Studien anderer Institute weisen in der Mehrzahl ähnliche Tendenzen auf. Köchling et al. (1997) beschreiben bei ihrem engmaschigen Monitoring bei 57 erwachsenen Patienten mit unterschiedlichen malignen Diagnosen bei Stimulation mit G-CSF ein Maximum der CD34+ Zellen ca. 8 Stunden nach dem G-CSF-Bolus. Als optimalen Zeitpunkt für die Apherese resultierten aus diesen Untersuchungen die Stunden 6 bis 10 nach G-CSF Gabe bei einem G-CSF-Bolus um 6 Uhr morgens. Demgegenüber stellt sich in der gleichen Studie der Zeitpunkt 2 Stunden nach subcutaner G-CSF-Gabe, 8 Uhr morgens also, mit einer minimalen CD34+ Zellkonzentration im peripheren Blut als eher ungünstig dar. Wenngleich diese Studie an Erwachsenen durchgeführt wurde, so liegt die beschriebene Zeitspanne für eine optimale Apherese bereits nahe an denen in unserer Studien gefundenen Ergebnissen. Der vorgeschlagene Zeitraum von Stunde 6 bis Stunde 10 nach G-CSF-Bolus in der Studie von Köchling deckt sich mit der in dieser Arbeit gezeigten optimalen Apheresezeit ab der 8. Stunde nach G-CSF-Gabe, in der sich keine Minimalkonzentrationen für CD34+ Zellen mehr fanden, aber mehr als die Hälfte aller Maximalkonzentrationen zu finden waren.

In ähnlicher Art und Weise werden diese Ergebnisse bei Erwachsenen von Kiefer et al. gestützt, deren optimaler Apheresezeitraum ebenfalls ab der 8. Stunde nach G-CSF beschrieben ist. Die Ergebnisse der Studie von Kiefer et al. (1997) zeigen auf, dass sich am Tag der Leukapherese bei einer subkutanen Injektion von G-CSF um 6 Uhr morgens ein Maximum an CD34+ Zellen im peripheren Blut bei erwachsenen Patienten vor autologer Stammzelltransplantation zwischen 14 bis 20 findet. Dies entspricht einem optimalen Apheresezeitraum von Stunde 8 bis Stunde 14 nach G-CSF-Gabe, bei einem Zeitraum von Stunde 0 bis Stunde 6 nach G-CSF mit minimalen CD34+ Zellkonzentrationen im peripheren Blut.

Eine von dem hier gefundenen optimalen Apheresezeitraum differierende Aussage enthält die Studie von Fischer et al. Fischer et al. (1994) zeigen einen mehrfach in Studien und der klinischen Praxis als geläufig beschrieben optimalen Apheresezeitpunkt von 4 Stunden nach G-CSF-Gabe auf. Dabei wurde an erwachsenen Patienten ein über 12 Stunden durchgeführtes Monitoring mit zweistündigem Messintervall durchgeführt, das sowohl eine maximale G-CSF-Plasmakonzentration als auch eine maximale CD34+ Zellkonzentration 3-4 Stunden nach subcutanem G-CSF-Bolus aufwies. Diese Ergebnisse decken sich nicht mit den hier dargestellten. Es konnte im Gegenteil gezeigt werden, dass gerade bei Kindern und Jugendlichen zwischen der 4. und 6. Stunde nach G-CSF eine besonders niedrige CD34+ Zellkonzentration im peripheren Blut vorlag. Das stark unterschiedliche Kollektiv dieser beiden Studien stellt eine mögliche Ursache für das Abweichen der Ergebnisse voneinander dar, jedoch bleibt zu bedenken, dass mehrfach aufgezeigt wurde, welche geringe Rolle das Alter und Geschlecht des Patienten sowie die Tumorart selbst für die Stammzellmobilisierung zu spielen scheint.

Das hier vorgelegte Datenmaterial weist des Weiteren darauf hin, dass es möglich ist, die Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen bei den einzelnen Individuen in ein grobes Raster einzuteilen, nämlich dem initialen Anstieg bzw. Abfall der CD34+ Zellkonzentration nach G-CSF-Bolus. Die vorliegende Arbeit unternimmt daher eine weitere Analyse zur Aufschlüsselung des Mobilisierungsmusters bei den einzelnen Individuen, um allgemeinere Aussagen über die Mobilisierung und damit über den Erfolg der Apherese tätigen zu können. Anhand der dargestellten Konzentrationsverläufe der CD34+ Zellen im peripheren Blut der Kinder darf postuliert werden, dass es für jeden Patienten an dem entsprechenden Tag unter den gegebenen Bedingungen mindestens einen optimalen Zeitpunkt gab, an dem die für die Apherese zur Verfügung stehende CD34+ Zellen im peripheren Blut in maximaler Anzahl vorlagen. Dieser Zeitpunkt gilt für jeden dieser Patienten individuell, eine gemeinsame, Patientengruppen umfassende Aussage ist schwerlich zu machen. Die Untersuchung der individuellen Patientendaten kann jedoch soweit gehend vereinheitlichen, dass die Zuordnung zu zwei unterschiedlichen Mobilisierungsverhalten möglich wird: Patienten, die auf G-CSF-Gabe mit initialen CD34+ Zellanstieg reagieren (Mobilisierungstyp I), und Patienten, deren CD34+ Zellkonzentration im Blut zunächst sinkt (Mobilisierungstyp II). Eine derartige Einteilung ermöglicht einerseits eine weitere Aufschlüsselung relevanter Parameter zur Identifizierung der Gruppe, welcher der jeweilige Patient angehört. Andererseits bietet diese Aufbereitung der Mobilisierungstypen die Möglichkeit, die Aussagen unterschiedlicher Studien über den optimalen Apheresezeitpunkt einander anzunähern, indem einem Grossteil der jeweiligen Patienten die Zugehörigkeit zu jeweils unterschiedlichen Mobilisierungstypen zugesprochen wird. Keine der in der Literatur gefundenen Studien hat einen Unterschied in der Mobilisierung unterschiedlicher Patientensubpopulationen beschrieben, sofern diese überhaupt in Bezug auf Stunden nach G-CSF-Gabe untersucht wurden. Wenn individuelle Unterschiede in der Art der Mobilisierung, in der Anzahl der Maxima und Minima festgestellt wurden, so wurden sie in den Veröffentlichungen nicht beschrieben. Dementsprechend fehlen vergleichbare Daten zur Art der Stammzellmobilisierung bei

den Individuen, insbesondere über pharmakodynamische Verläufe und Anzahl sowie Abfolge der Maximal- und Minimalkonzentrationen. Dabei sind, gerade für einen praktischen Nutzen einer solchen Erkenntnis, vor allem die Eigenschaften eines solchen Graphen in Bezug auf seinen Verlauf von größter Wichtigkeit. Ein anfänglicher Anstieg oder auch Abfall der CD34+ Zellkonzentration erscheint in Hinblick auf die Findung eines optimalen Sammelzeitpunktes besonders interessant, beachtet man den vielfach nachgewiesenen engen Zusammenhang zwischen Stammzellkonzentration im peripheren Blut und Aphereseerfolg. Daher erscheint es sinnvoll, bei weiteren Untersuchungsreihen oder auch retrospektiv bei bereits ausgewerteten Monitorings den Kurvenverlauf auf eine mögliche Differenzierung in die oben beschriebenen Gruppen zu überprüfen.

4.1.2 Prädiktionswerte für den CD34+ Zellanstieg

4.1.2.1 Die Leukozytenkonzentration als Prädiktionsparameter

In mehreren Studien ist hinreichend auf die Korrelation der CD34+ Zellkonzentration im peripheren Blut der Patienten direkt vor der Apherese und der Anzahl der CD34+ Zellen im Aphereseerzeugnis hingewiesen worden. Daraus ist zu schließen, dass von einer effektiven Optimierung der CD34+ Zellmobilisation vor allem dann gesprochen werden kann, wenn damit die effektive CD34+ Zellkonzentration zum Zeitpunkt der Apherese angehoben werden kann. Neben der Problematik, wie dieser Anstieg selbst zu optimieren ist, stellt sich aus der klinischen Situation weiterhin die Frage, ob es eine Möglichkeit gibt, den Anstieg der CD34+ Zellkonzentration im peripheren Blut der pädiatrischen Patienten auch ohne eine direkte Bestimmung der CD34+ Zellen zu ermitteln.

Die Untersuchung der Voraussagewerte der Leukozyten über den Verlauf der CD34+ Zellkonzentration im peripheren Blut der Patienten, dem am höchstem mit dem Aphereseerfolg korrelierenden Prädiktorwert, konnte zeigen, dass die Leukozyten im Tagesverlauf einen unzureichenden Prädiktorwert darstellen. Korreliert man die relativen CD34+ Zellkonzentrationen mit den relativen Leukozytenkonzentrationen zu den Zeitpunkten der einzelnen Messungen, ergeben sich nach der Pearson-Korrelation

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - n \cdot \bar{x} \bar{y}}{\sqrt{\left(\sum_{i=1}^n x_i^2 - n \cdot \bar{x}^2 \right) \left(\sum_{i=1}^n y_i^2 - n \cdot \bar{y}^2 \right)}}$$

mit einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p = 0.002$. Dies entspricht zwar einem relativ hohen rechnerischen Korrelationswert, und Olivieri et al (1994) beschreiben in ihrer Studie an 61 erwachsenen Patienten eine gute Korrelation zwischen den Leukozyten- und Stammzellkonzentrationen. Betrachtet man jedoch den bereits in Abbildung 3.25 dargestellten durchschnittlichen relativen Verlauf der beiden Parameter, so kann ein Abfall der CD34+ Zellen von Stunde 5 auf Stunde 6

festgestellt werden, während Leukozyten in diesem Zeitraum ansteigen. Auch der Konzentrationsabfall der CD34+ Zellen im peripheren Blut nach einem Maximum um Stunde 11 nach G-CSF-Bolus verläuft nicht parallel zu der weiterhin mindestens auf Niveau bleibenden Leukozytenkonzentration. Somit sollte ein hoher Korrelationskoeffizient der Pearson-Korrelation nicht darüber hinwegtäuschen, dass die eigentliche Aussage, die man sich von einer Beobachtung der Leukozytenkonzentration im peripheren Blut erhofft, namentlich eine mögliche Voraussage über die Anstiegsdynamik der CD34+ Zellen, nur in Einzelfällen zuverlässig, im Durchschnitt aber gerade während des Leukozytenanstiegs zwischen Stunde 5 und 6 nach G-CSF-Bolus einen CD34+ Zellanstieg impliziert, wenn die CD34+ Zellkonzentration abfällt.

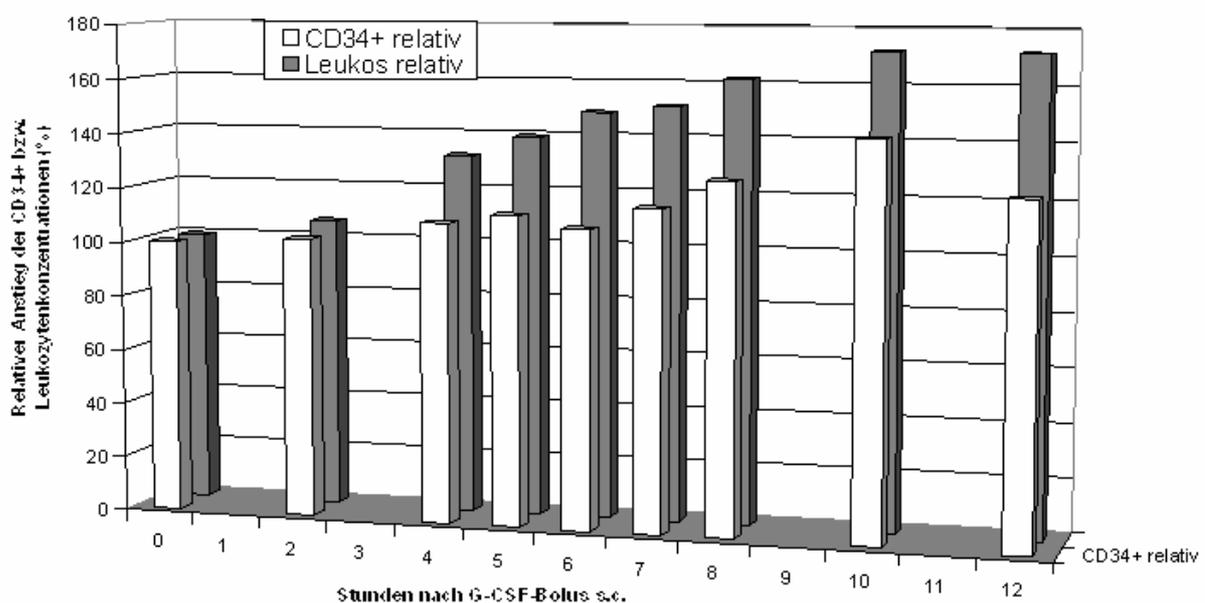


Abb. 4.1 Verlauf der relativen CD34+ (vorne) und Leukozytenkonzentrationen (hinten) bei 14 pädiatrischen Patienten unter dem Einfluß von G-CSF; vergleichende Darstellung. Deutlich sind die Abweichungen der beiden Messreihen im Konzentrationsverlauf insbesondere zur Stunde 6 und Stunde 12 nach G-CSF-Bolus zu erkennen. Dem jeweiligen weiteren Anstieg bzw. Plateau der Leukozytenkonzentration im peripheren Blut steht ein Plateau bzw. Abfall der CD34+ Konzentration entgegen.

Noch deutlicher wird der nur grob parallele Verlauf der beiden Zellkonzentrationen, wenn die Anzahl der CD34+ Zellen / μl jeder Einzelmessung gegen die Anzahl der Leukozyten (in Kohorten eingeteilt) aufgetragen werden (s. Abb. 3.26). Obgleich ein Anstieg der mittleren Konzentration an CD34+ Zellen mit der Zunahme der Leukozytenkonzentration festzustellen ist, erfolgt dieser nicht proportional und weist im Bereich von 10000 bis 39000 Leukozyten/ μl ein Plateau auf. Zudem fällt bei der Betrachtung der Einzelwerte auf, dass die maximale Konzentration der CD34+ Zellen nicht in der Gruppe der maximalen Leukozytenkonzentration ($>40\ 000/\mu\text{l}$) zu finden ist, sondern in der Gruppe mit 10000 bis 19000 Leukozyten/ μl . Des Weiteren ist in einem Messbereich von 10000 bis 39000 Leukozyten/ μl kein signifikanter Anstieg

der durchschnittlichen CD34+ Zellkonzentration im peripheren Blut nachzuweisen, obgleich dieser Bereich mit 78 Leukozytenkonzentrationen (von insgesamt 113) einen Grossteil der Messergebnisse einschließt.

Insbesondere die Ergebnisse von Urashima M et al (1994) und Yu J et al (1999), die eine gute Korrelation der CD34+ Zellkonzentration im peripheren Blut zur Pherisatausbeute beschreiben, weisen auf, dass die Leukozyten keinen guten Prädiktivwert für den Mobilisierungserfolg über mehrere Tage darstellen. Somit können die hier dargestellten Ergebnisse als Ergänzung und Verfeinerung der Messintervalle gesehen werden, die eine solche Prädiktivaussage der Leukozyten eben nicht stützten.

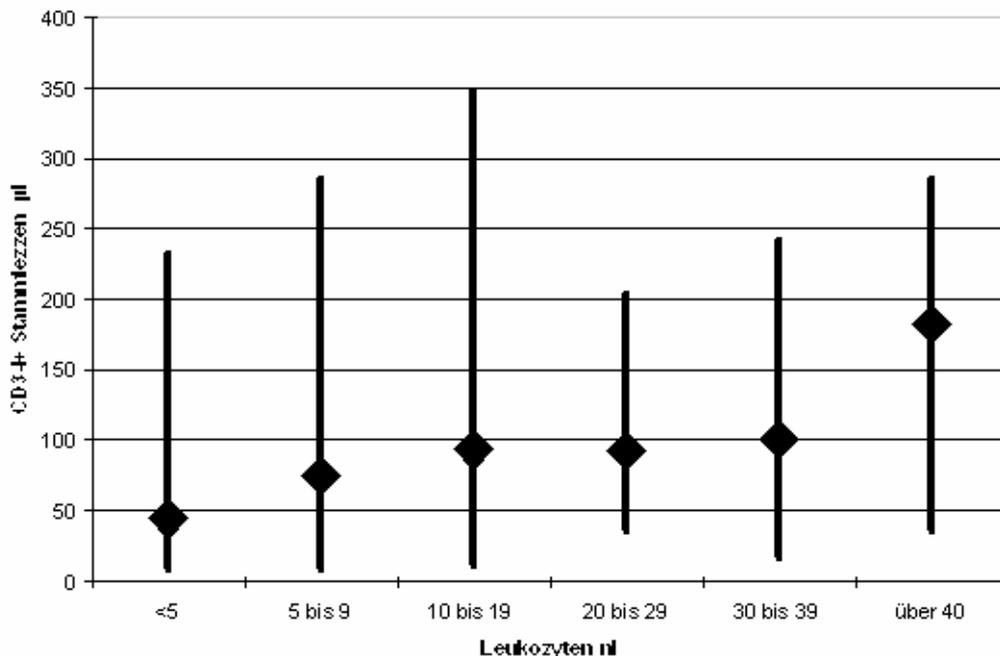


Abb. 4.2 Aufteilung der Konzentrationen der CD34+ Stammzellen aus den Einzelmessungen gegen die Kohorten der Leukozytenkonzentrationen. Die ausgefüllten Kästen repräsentieren den Mittelwert der CD34+ Konzentration im peripheren Blut, die schwarzen Balken beschreiben die Spannweite der Messwerte von der minimalen zur maximalen Konzentration. Auffällig ist, dass die Anordnung der maximalen CD34 Zellen/µl nicht der Anordnung der maximalen Leukozytenkonzentration entspricht: Der CD34+ Zellkonzentrationsmaximum liegt bei 10000 bis 19000 Leukozyten/µl, und eben nicht im Messbereich von 10000 bis 39000 Leukozyten/µl.

Die Ergebnisse unserer vorliegenden Studie decken sich jedoch mit denen von Urashima M et al (1994) und Yu J (1999), die beide darlegen, dass die absolute oder auch relative Leukozytenkonzentration im peripheren Blut keine ausreichende Aussage über die aktuelle CD34+ Zellzahl und damit in letzter Konsequenz auch über den Erfolg einer Apherese zulassen. Auch in den Untersuchungen von Dären et al (1998) erweisen sich die Leukozyten als unzureichender Prädiktivparameter. Während die genannten Studien sich jedoch insbesondere auf die Dynamik der Mobilisierung über mehrere Tage hinweg beziehen, zeigten die hier vorgelegten Ergebnisse, dass auch in Bezug auf stündliche, also tagesdynamische Entwicklung

keine Aussage mit Hilfe der Leukozyten gemacht werden können. Somit unterstützen und erweitern die hier vorliegenden Daten die bereits durchgeführten Untersuchungen in Bezug auf die Tagesdynamik der Stammzellausschüttung. Denn während bei einigen Patienten der Anstieg der Leukozytenkonzentration, unter der Prämisse eines Zusammenhangs zwischen den Parametern, im peripheren Blut gerade dann ein Maximum an CD34+ Zellen implizierte, wenn de facto ein Minimum vorlag, zeigten andere Verläufe einen stetigen Anstieg der Leukozytenzahlen bei dauerndem Abfall der CD34+ Zellzahl. Signifikante Korrelationen oder Parallelverläufe der Leukozyten- und CD34+ Zellkonzentrationen konnten nicht gefunden werden.

4.1.2.2 Andere Parameter des peripheren Blutbildes als Prädiktionsparameter

Für G-CSF sind bisher keine direkten Einflüsse auf die Erythropoese beschrieben worden. Dementsprechend konnte auch in dieser Beobachtungsreihe kein Nachweis über eine Beeinflussung der Erythropoese durch G-CSF erbracht werden, eine Prädiktion mit Hilfe erythrozytenabhängiger Blutbildparameter ist nicht möglich. Zwar zeichnet sich auch bei den Erythrozyten über die 12 Stunden des Messzeitraumes ein Schwankung in der Konzentration ab, die Abweichung vom Ausgangswert jedoch nur sehr gering und betragen im Durchschnitt maximal 6%. Korreliert man zudem die Verläufe der Erythrozytenkonzentration mit denen der CD34+ Zellen im peripheren Blut, so kann (bei einem Korrelationskoeffizienten in der Pearson-Korrelation von $r = -0.019$) keine Korrelation festgestellt werden. Dementsprechend scheint es auch bei den Erythrozyten eine tageszeitlichen Schwankung unter Mobilisierung mit G-CSF zu geben, die jedoch nicht mit dem Anstieg der CD34+ Zellen korreliert. Hämoglobinkonzentration, Hämatokrit, Erythrozytenvolumen, mittlerer corpusculärer Hämoglobingehalt und mittlere corpusculäre Hämoglobinkonzentration können ebenfalls nicht mit der CD34+ Zellkonzentration korreliert werden und somit keinen Hinweis auf den Verlauf der CD34+ Zellen zur Optimierung des Apheresezeitpunktes geben.

Obgleich der Verlauf der relativen durchschnittlichen Thrombozytenkonzentration einen einfachen Anstieg mit Maximum zum Zeitpunkt 5 Stunden nach G-CSF-Bolus zeigt, konnte auch hier keine Korrelation festgestellt werden. Bei einem Korrelationskoeffizienten in der Pearson-Korrelation von $R = 0,035$ ist nicht von einem Zusammenhang auszugehen.

Somit kann für keinen der sonst im Routineblutbild erhobenen Messwerte eine Korrelation zur CD34+ Zellkonzentration im peripheren Blut beschrieben werden, die eine klinisch relevante Aussage für den optimalen Apheresezeitpunkt zulässt.

4.2 Weitere Einflüsse auf die Mobilisierung von CD34+ Zellen nach G-CSF-Bolus

4.2.1 Diagnose

Ein Einfluss der malignen Grunderkrankung (und damit auch der unterschiedlichen Chemotherapien) auf die Art der CD34+ Mobilisierung bei pädiatrischen onkologischen Patienten ist in der Literatur nur wenig beschrieben worden. Dennoch zeigt die vorliegende Studie Tendenzen, die für eine differenzierte Behandlung der Tumorarten im Vorfeld der Apherese sprechen könnten.

Als Auffälligkeit kann gewertet werden, dass 7 der 8 Neuroblastompatienten mindestens ein CD34+ Zellkonzentrationsminimum in ihrem Mobilisierungsverlauf aufwiesen, nur ein Neuroblastompatient zeigte kein solches Minimum. Bei den Patienten mit Tumoren anderer Genese zeigten nur 3 Patienten einen Verlauf mit CD34+ Zellminimum, drei einen Verlauf ohne ein solches. Dies könnte als Hinweis darauf zu sehen sein, dass bei Neuroblastompatienten die Notwendigkeit eines Monitoring zur Feststellung eines CD34+ Zellkonzentrationsminimums im Verlauf der Mobilisierung und damit zur Vermeidung einer Apherese im selbigen Zeitraum besteht. Dies schließt jedoch ein solches Monitoring bei Patienten mit Tumoren anderer Genese nicht aus, da auch hier in 50% der Fälle mindestens ein Minimum vorlag.

Auch andere Autoren haben Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Tumorart und der CD34+ Zellmobilisierung aufgezeigt. Haas et al. (1994) beschreiben ein Kollektiv von 61 Patienten, in dem die Effizienz der Sammlung und der vorausgegangenen Mobilisierung der Stammzellen bei den 16 Hodgkin-Patienten signifikant schlechter war als bei den 45 Non-Hodgkin-Patienten. Dabei betonen die Autoren jedoch, dass alle Hodgkin-Patienten zum Zeitpunkt der Apherese bereits einer Strahlentherapie unterzogen worden waren, deren Einfluss auf das Ergebnis letztlich nicht geklärt werden kann. Gerade gegen einen solchen negativen Einfluß der Strahlentherapie bei Hodgkin-Lymphomen liegen jedoch Daten einer Studie mit 54 Patienten vor, bei der kein signifikanter Einfluß der Strahlentherapie festgestellt werden konnte (Canales MA et al. 2001), was erneut für einen Unterschied in der Stammzellmobilisierung bei Hodgkin- und Non-Hodgkin-Patienten spricht.

Korrelationen zwischen anderen Parametern und Mobilisierungserfolg bei unterschiedlichen Tumorarten, wie Alter, Geschlecht, vergangene Zeit seit letzter Chemotherapie wurden nicht gefunden. Yu et al. (1999) berichten über einen schlechteren Prädiktwert der CD34+ Zellzahl im peripheren Blut vor Apherese bei Patienten mit Brustkrebs und akuter myeloischer Leukämie im Vergleich zu Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen. Andere Autoren arbeiten vor allem mit Tumoren des Erwachsenenalters oder mit gesunden Probanden bzw. Spendern zur allogenen Stammzelltransplantation, so dass ein Vergleich entfällt. Während Kiefer et al. (1997) Brustkrebspatientinnen, Fischer et al. (1994) mit Patienten nicht vorbehandelten Brustkrebs und vorbehandelte Lymphomen beobachtete, wurden bei Köchling et al. (1997) Patienten mit akuter myeloischer Leukämie und mit Non-Hodgkin-Lymphomen untersucht. Eine Studie, die sich explizit mit pädiatrischen Patienten und den bei ihnen vorkommenden Tumorarten befasst, ist die von Kanold et al (1998). Während diese Autoren sich auch auf die Mobilisierung zwischen zwei G-CSF-Gaben beziehen, beschreiben Kanold et al. (1998), die eine Untersuchung an 42 Patienten

mit unterschiedlichen leukämischen und soliden Tumoren durchgeführt haben, keinen Zusammenhang zwischen Mobilisierungserfolg und Diagnose für die Tage vor der Apherese.

Interessant erscheint weiterhin, dass der Zeitpunkt der maximalen CD34+ Zellkonzentration im peripheren Blut bei den hier untersuchten Neuroblastompatienten gut 3 Stunden nach dem Zeitpunkt bei Nicht-Neuroblastompatienten liegt (6,3 Stunden nach G-CSF gegen 9,1 Stunden nach G-CSF). Auch hierfür gibt es in der Literatur keine sonstigen Anhaltspunkte. Insbesondere der Vergleich der Autoren, die eher eine frühe Apherese bevorzugen, wie oben genannten Fischer et al. (1994), und Autoren mit einem Vorzug für den späteren Zeitpunkt (z.B. Kiefer et al. 1997), haben selbst nicht mit Neuroblastompatienten gearbeitet, die Patientengruppe der Brustkrebskranken wird in beiderlei Studien untersucht.

Somit darf – von Quellen anderer Autoren gestützt, zusammengefasst dargestellt werden, dass eine differenzierte Vorgehensweise zur Findung des optimalen Apheresezeitraum bei Patienten mit unterschiedlichen Tumorarten und Vortherapie, in diesem Fall insbesondere bei pädiatrischen Neuroblastompatienten, notwendig ist.

4.2.2 Geschlecht

Die Untersuchungen auf einen Einfluss des Geschlechts der Patienten auf die Art der CD34+ Zellmobilisierung erbrachte ebenfalls Hinweise auf Unterschiede bezüglich der beiden Kollektive. Kein männlicher Patient erreichte ein Maximum der CD34+ Zellen vor Stunde 5 nach G-CSF-Gabe, wogegen sich die Maxima bei den Patientinnen auf den gesamten Untersuchungszeitraum verteilten und sich insbesondere um Stunde 8 nach G-CSF-Gabe häuften. Dies führte zu einer durchschnittlichen maximalen CD34+ Zellkonzentration um die Stunde 10 bei den Jungen, bei den weiblichen Patienten bereits um die Stunde 6. Die Standardabweichung für die männlichen Patienten betrug 2,75 bei einem Median von 10 Stunden, für die weibliche 3,3 bei einem Median von 8 Stunden. Der optimale Apheresezeitpunkt für dieses Kollektiv stellt sich somit geschlechtsabhängig da. Eine Apherese zwischen den Stunden 4 und 6 bei den sieben hier vorgestellten Patientinnen wäre somit immer mit einem relativen oder absoluten CD34+ Zellkonzentrationsminimum zusammengefallen, womit sich die These ergibt, bei Mädchen eine Sammlung möglichst nicht in diesem Intervall, sondern evt. vorher oder um die Stunde 8 nach G-CSF-Bolus durchzuführen. Bei Jungen trat ein relatives oder absolutes Maximum der CD34+ Zellen erst ab der Stunde 8 nach G-CSF auf, womit sich ein optimaler Apheresezeitraum eben erst nach diesem Zeitpunkt ergibt.

Demgegenüber konnten bei anderen Studien, bei denen es jedoch jeweils um ein über mehrere Tage und nicht im stündlichen Abstand gemessenes Monitoring der CD34+ Zellen ging, keine solchen geschlechtsspezifischen Unterschiede herausgearbeitet werden. Haas et al. (1994) konnten in ihrem Kollektiv von 61 erwachsenen Hodgkin und Non-Hodgkin-Lymphomen keinen geschlechtsspezifischen Unterschied in Bezug auf die Mobilisierung der CD34+ Zellen finden. Ebenso war das Geschlecht der 56 Patienten von Vantelon JM bei der

Entwicklung des oben beschriebenen Prädiktions-Scores für die Stammzellapherese nicht ausschlaggebend.

Obgleich also andere Studien keine Bedeutung im Geschlecht des Patienten für die Findung des Optimalen Apherese-Zeitpunktes beschreiben, kann mit den vorliegenden Daten ein solcher Einfluß nicht ausgeschlossen werden.

4.2.3 Alter

Die Aufteilung in drei Altersgruppen brachte keine signifikanten Ergebnisse unter Berücksichtigung der CD34+ Zellzahl. Kinder der Altersgruppe 1 zeigten jedoch ausschließlich den Mobilisierungstyp I (initialer Anstieg). Eine Korrelation zwischen Zuordnung zu einer der drei Altersgruppen und Mobilisierungstyp konnte dennoch nicht hergestellt werden, und war nach Sichtung der Literatur auch nicht zu erwarten. Anderlini et al. (1997) weisen darauf hin, das gesunde Stammzellspender mit einem Lebensalter von mehr als 55 Jahren eine signifikant schlechtere Ausbeute an Stammzellen hervorbringen als vergleichbare jüngere Spender. Zwar beschreibt die Studie eine tendenzielle gegenläufige Korrelation von Alter und Aphereseerfolg, jedoch ist eine signifikante Aussage nur für das höhere Lebensalter zu treffen und in der Kindheit nicht nachweisbar. De la Rubia J et al. (2002) konnten die Altergrenze, nach deren Überschreiten eine negative Korrelation zwischen Alter und Aphereseerfolg besteht, in einer Untersuchung an 103 gesunden Probanden auf 38 Jahre senken, in den Bereich der onkologischen Pädiatrie scheint sich dieses Problem jedoch nicht auszuwirken. Dagegen konnten Vantelon JM et al. (2000) an 56 Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen keine Korrelationen zwischen Alter und Aphereseerfolg feststellen.

Die hier vorgelegten Daten zeigen somit - wie vergleichbare Untersuchungen - keinen Hinweis auf einen Einfluss des Alters bei Kindern auf den optimalen Apheresezeitpunkt.

4.2.4 Mobilisierung

Die Untersuchung der Leukozytenkonzentrationsveränderungen bzw. der CD34 Mobilisierungstypen hinsichtlich der Mobilisierungsdauer und auch der Mobilisierungsdosis erbrachten keine Erkenntnisse über mögliche Zusammenhänge. Untersuchungsergebnisse hinsichtlich dieses Zusammenhangs liegen bei pädiatrischen Patienten bisher auch nicht vor. Zwar zeigte sich, dass eine im Median kürzere Stimulationsdauer mit einem einfachen Leukozytenanstieg bzw. mit einem einfachen Leukozytenmaximum einherging, bei den Mobilisierungstypen war jedoch kein Unterschied in Bezug auf die Mobilisierungsdauer festzustellen. Auch eine statistische Korrelation zwischen Mobilisierungsdauer und CD34 Maximumkonzentration während des Monitoring konnte nicht nachgewiesen werden. Ebenso wenig trifft dies für die Dosierung des G-CSF/kgKG/d zu. Weder eine Korrelation mit der CD34 Maximumkonzentration während des Monitoring, noch ein signifikanter Zusammenhang mit Leukozyten- und CD34+ Mobilisierungsverlauf wurden festgestellt. Die Literatur hingegen gibt klare Hinweise für einen solche Zusammenhang vor allem im Bereich der hier untersuchten Dosierungen von ca. 5-

10 µg/kgKG/d G-CSF. Obgleich von einer direkte Dosis-Wirkungsbeziehung nicht ausgegangen werden darf, wirken nach Martinez C et al 1997 höhere Dosen G-CSF besser als niedrige. Zudem haben sowohl Arbona C et al. 1998 als auch Kröger N et al 1998, dass eine auf zwei Gaben verteilte Gesamtdosis von 10 µg/kgKG/d eine bessere Mobilisierung hervorrufen, als eine gleichgroße Einzeldosis. Somit decken sich die in unserer Studie gezeigten Beobachtungen nicht mit denen in der Literatur, was aber vor allem auf die geringe Patientenanzahl zurückzuführen sein dürfte. Ein Unterschied in der Wirkung bei unterschiedlichen Dosierungen scheint also gegeben.

4.3 Das klinische Stammzellmonitoring

4.3.1 Notwendigkeit und Voraussetzungen

Die Sichtung der Literatur und die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchung zeigen, dass bei pädiatrischen Patienten eine individuelle Schwankungsbreite in den Mustern der CD34+ Stammzellmobilisation besteht. Voraussagen über die Art der Mobilisierung bei einem bestimmten Patienten lassen sich somit ohne vorherige Analyse des CD34+ Anstiegs nur schwerlich treffen. Daher bedarf es zur Optimierung des Apheresezeitpunktes vor der Stammzellsammlung eines standardisierten Verfahrens zur Findung des optimalen Apheresezeitpunktes. Dafür eignet sich, wie Locatelli et al (1998) beschreiben, ein Stammzellmonitoring im Vorfeld der Apherese. Beachtet man die hier vorgelegten Daten und mit diesen verbundene Streuweite der Maxima und Minima, und beachtet man, dass bei vier der hier untersuchten Patienten die Konzentration der CD34+ Zellen am Ende des Monitoring unterhalb der Ausgangskonzentration lag, erscheint ein klinisches Monitoring zur Festlegung des Zeitpunktes sinnvoll, eine pauschalisierte Fixierung des Apheresezeitpunktes hingegen wenig sinnvoll.

Die nahe liegende Lösung, weitere messbare Parameter zu finden, die einerseits die CD34+ Zellmobilisierung im peripheren Blut des Patienten hinreichend widerspiegeln, andererseits jedoch den Aufwand für Patienten und die behandelnden Institutionen senken, ist aus oben erwähnten Gründen bisher nicht praktikabel. Zwar hat es mehrfach Ansätze gegeben, mit Hilfe von Parametern, die einfacher und billiger zu bestimmen sind als direkt die CD34+ Zellzahl, eine Aussage über den Stimulationserfolg mit G-CSF zu finden. Die dabei untersuchten Parameter des Blutbildes sind dazu wie oben dargestellt nicht geeignet. Insbesondere wird deutlich, dass eine hinreichend genaue Aussage über den idealen Apheresezeitpunkt im Sinne einer maximalen Ausschöpfung des zirkulierenden Stammzellpotentials eines Stimulationszyklus vor allem über die CD34+ Zellkonzentration im peripheren Blut selbst bestimmt werden kann. Es ist bekannt, dass eine einfache, tägliche Messung der CD34+ Zellkonzentration eine gute Voraussage über den Aphereseerfolg zulässt, wenn man den Grenzwert von mindestens 20 CD34+ Zellen/µl peripheren Blutes berücksichtigt. Diese Messungen ignorieren jedoch Schwankungen in der Stammzellkonzentration im Blut, da sie sich auf einen einzigen, nicht systematisch gewählten und konsequent eingehaltenen Zeitpunkt während eines Tages beziehen, in dessen Verlauf die Anzahl der CD34+ Zellen im peripheren Blut einer gewissen Schwankung unterliegt. Da sich eine Folge von CD34+Zellzählungen im Rahmen

einer Stammzelltransplantationsvorbereitung in Tagesabständen als zuverlässiger Marker für den Aphereseerfolg bestätigt hat, darf angenommen werden, dass die Verkürzung der Zeiträume zwischen den Messungen zumindest keine Verschlechterung der Aussage, möglicherweise sogar eine Verbesserung derselben hervorbringen könnte. Wenn aber jeder einzelne Messpunkt in einem CD34 Monitoring eine gut korrelierende Aussage über den späteren Aphereseerfolg zulässt, so kann ein Monitoring in seiner Gesamtaussage ebenfalls Hinweise auf einen möglichst günstigen Sammelzeitpunkt geben.

Eine solche Zellanalyse setzt einen Mindestaufwand an Zeit und Geld voraus, der nicht unerheblich ist. Ein vollständiges Monitoring, wie in der vorliegenden Studie durchgeführt, möglicher Weise noch über 24 anstatt 12 Stunden, wird, auch in Hinsicht auf die Belastbarkeit der Patienten, somit unmöglich. Daher stellt sich die Frage, wie häufig und in welchen Abständen CD34+ Zellkonzentrationsbestimmungen durchzuführen sind, ohne den Patienten zu stark zu belasten, die Kosten in die Höhe zu treiben und zugleich eine klinisch relevante Aussage über den optimalen Zeitpunkt der Apherese zu finden. Zur Häufigkeit und Frequenz, mit denen solche Messungen sinnvoll wären, gibt es jedoch bisher keine Daten, vor allem keine aus dem Bereich der pädiatrischen Onkologie. Studien, die sich mit dem Stammzellmonitoring auseinandersetzen, werfen zwar die Frage nach der Notwendigkeit eines solchen präapheretischen Monitoring auf, beantworten sie jedoch nicht, noch geben sie klare Instruktionen für die Durchführbarkeit eines solchen. Kiefer et al (1997) führten zur Beschreibung der Pharmakodynamik von G-CSF ein Monitoring über 24 Stunden mit Messintervallen von 2 Stunden durch. Köchling et al. (1997) setzen für ihr klinisches Monitoring bei 12 erwachsenen Patienten (Altersmedian 59 Jahre, Range 19-71 Jahre) ein Probeentnahmeraster von Entnahmen alle 2 Stunden ab 6 Uhr morgens bis 22 Uhr, und dann eine weitere Entnahme am folgenden Morgen 6 Uhr ein. Dies erfordert mit der Nullwertmessung zehn CD34+ Zellkonzentrationsbestimmungen. Dieses engmaschige Raster scheinen geeignet für klinische Studien an erwachsenen Gesunden oder Patienten, eine Umsetzung für den Gebrauch in der Klinik ist jedoch nicht beabsichtigt und aus Gründen der Logistik, der Kosten und der Compliance auch kaum denkbar.

Ein weiteres Raster, ebenfalls über 24 Stunden verwendet, geben Bjarnason et al. (1996) vor, indem sie die CD34+ Zellkonzentration im peripheren Blut jeweils im 4-Stunden Abstand messen, wobei die G-CSF-Gabe über 6 x 4 Tage hinweg jeweils zu einem randomisierten Zeitpunkt vier Tage hintereinander durchgeführt wurde. Diese Messmatrix verringert die Zahl der Messungen pro Tag auf 7 Messungen, wobei nur die Blutentnahme um 24 Uhr und die um 4 Uhr in die Schlafenszeit fallen. Diesen Vorteilen steht vor allem der immer noch beachtliche finanzielle und organisatorische Aufwand gegenüber, zudem wird vorausgesetzt, dass die Minima und Maxima der CD34+ Zellkonzentrationsverläufe mit einem Raste von je 4 Stunden Abstand sicher zu erfassen sind, was – wie gezeigt - der Studienlage nicht entspricht.

4.3.2 Berücksichtigung des Mobilisierungstyps und des Patientengeschlechts

Eine mögliche Lösung zur Findung eines idealen Sammelzeitpunktes könnte somit die Kanalisierung der Messungen auf aussagekräftige Zeitpunkte sein, die eine

Zuordnung zu den unterschiedlichen Mobilisierungstypen zulassen. Da 9 von 14 Patienten ein absolutes Maximum zwischen den Stunden 8 und 12 nach G-G-CSF-Bolus aufwiesen, sind mit Messungen zwischen der Stunde 8 und 12 nach Bolus ein Anteil von 64% der Maxima erfasst worden.

Möchte man ein umfangreiches Monitoring vermeiden, stellt sich zudem insbesondere die Frage nach dem initialen Anstieg oder Abfall der CD34+ Zellkonzentration. Um einen Patienten in das grobe Raster der Typ I bzw. Typ II-Mobilisierer einzuordnen, könnte eine Messung des 0-Stunden-Wertes und eine Messung z.B. des 2-Stunden-Wertes genügen. Alle hier untersuchten Patienten mit einem initialen Abfall zeigten zu diesem Zeitpunkt CD34 Werte unterhalb des Ausgangswertes.

Obwohl für pädiatrische Patienten bisher kein geschlechtsspezifischer Unterschied für die Mobilisierung CD34+ hämatopoetischer Stammzellen beschrieben wurden, zeigen die hier vorliegende Untersuchung, dass zumindest in diesem Kollektiv einige Aussagen über die Verteilung der Maximum- und Minimumkonzentration zulässig sind. Zum einen zeigten die Jungen kein Maximum der CD34+ Konzentration vor Stunde 5 nach G-CSF, dafür alle Minima außerhalb des Zeitraumes 3-5 und 9-12 Stunden nach G-CSF-Bolus. Mädchen hingegen zeigten alle Maxima bis Stunde 10, und alle Minima innerhalb der Stunden 4-6. Sollten sich diese Daten in weiteren Untersuchungen bestätigen, so wäre eine Anpassung des klinischen Präapherese-Monitoring an das Geschlecht zu erstreben.

4.3.3 Möglicher Ablauf eines klinisch orientierten Monitoring

Diese beiden Tendenzen – Zuordnung zu einem Mobilisierungstyp und möglicher Einfluß des Geschlechts auf den optimalen Apheresezeitpunkt - könnten zu einem Monitoring-Ablaufplan führen, der Anzahl der Messungen auf ein Minimum beschränkt, und dennoch eine Aussage über den Zeitpunkt der maximalen CD34+ Zellkonzentration im Blut zulässt.

Dass ein solches Monitoring einen Ausgangswert zur Stunde 0 (also vor G-CSF-Gabe) benötigt, versteht sich von selbst. Ohne einen solchen Vergleichswert wären Aussagen über den weiteren Verlauf, Anstieg und Abfall der CD34+ Zellkonzentrationen und letztlich über den Gesamtverlauf der Mobilisierung nicht möglich.

Als zweiter Messpunkt bietet sich eine CD34+ Zellkonzentrationsbestimmung ca. 2 Stunden nach G-CSF-Bolus an. Alle in dieser Studie untersuchten Patienten mit einer Typ-II-Mobilisierung zeigten hier Werte unterhalb des Ausgangswertes, wobei zu bemerken ist, dass zwei Patienten vom Typ I nach 2 Stunden noch keinen signifikanten Anstieg der CD34+ Konzentration aufwiesen.

Als dritten Messpunkt bietet sich der Zeitpunkt ca. 8 Stunden nach G-CSF-Gabe an – zu dem es bei im Durchschnitt bei den Patienten bereits zu einem Anstieg der CD34+ Zellen gekommen ist. Eine mögliche Anpassung an das Patientengeschlecht (frühere Messung bei Mädchen, spätere bei Jungen) könnten nach Sichtung größerer Datenmengen durchgeführt werden.

Ein solches Monitoring benötigt nicht zwingend einen Endpunkt. Er könnte dazu beitragen herauszufinden, ob der Klimax der Stimulation durch das applizierte G-CSF bereits überschritten ist, ob also der optimale Tag der Apherese bereits verpasst wurde. Dies wäre dann anzunehmen, wenn die CD34+ Zellkonzentration zum Zeitpunkt 12 h (oder in einem erweiterten Monitoring auch 24 h) niedriger liegt, als zum Monitoringbeginn.

Abbildung 4.3 demonstriert den möglichen Ablauf eines solchen Monitoring.

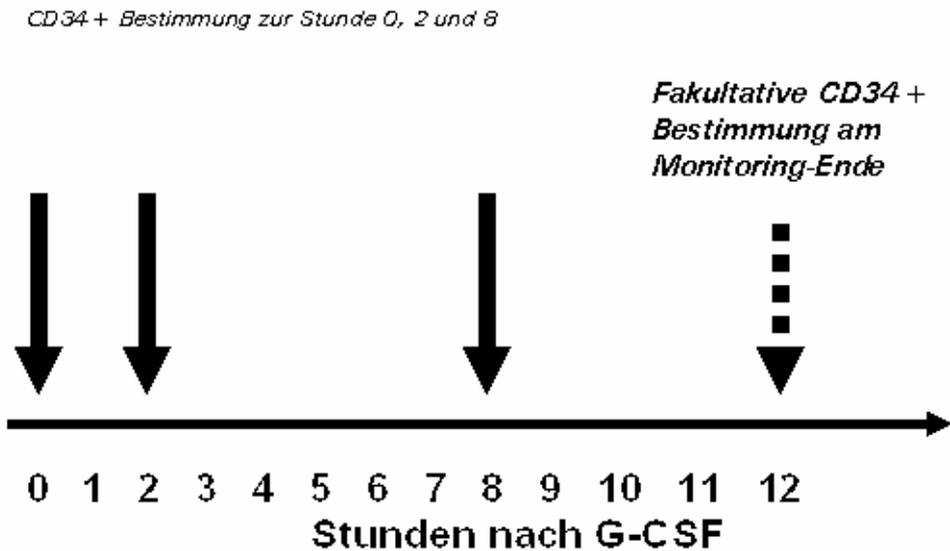


Abb. 4.3 Möglicher zeitlicher Ablauf für ein klinisches Monitoring der CD34+ Zellen zur Verbesserung der Zellausbeute bei der späteren Apherese durch Prädiktion des optimalen Apheresezeitpunkt. Nach Beginn des Monitoring unmittelbar vor G-CSF-Bolus s.c. erfolgen die nächsten Entnahmen zur Stunde 4 und zur Stunde 8 nach G-CSF-Bolus. Die letzte Entnahme erfolgt schließlich zur Stunde 11 nach G-CSF-Gabe.

4.3.4 Hypothetische Überlegungen zum Benefit aus den gewonnenen Daten

Wie ist nun der Benefit der hier dargestellten Untersuchung für den Patienten zu bewerten, und kann die Ausnutzung des Wissens um den optimalen Apheresezeitpunkt zu einem besseren klinischen „outcome“ führen? Die Darlegungen von Kasparu H et al 1996, Knudsen et al 1996 und Armitage S et al 1997, die einen engen Zusammenhang zwischen einer höheren CD34+ Zellzahl zum Zeitpunkt der Apherese und einer damit verbundenen optimaleren Aphereseausbeute aufzeigen, beflügeln jedoch zu der Überlegung, wie sich durch die richtige Wahl des Aphereszeitpunkts die Ausbeute optimieren lassen könnte. Denn durch diesen so beschriebenen Zusammenhang ist zu erwarten, dass die Apherese zum Zeitpunkt des CD34+ Maximums eine bessere Ausbeute erbringt, als zum Zeitpunkt einer Minimalkonzentration.

Ein Gedankenexperiment kann die Hypothese zu einem möglichen Benefit für unsere hier untersuchten Patienten unterstützen: Ausgehend von der Annahme, dass alle Parameter ein und desselben CD34 Monitoringverlaufes gleich bleiben, dass die Ausbeute der Apherese in einem gewissen Bereich eine lineare Proportionalität zur MCD34+ Zellkonzentration im peripheren Blut verläuft, und bei einer angenommenen Apheresedauer von ca. drei Stunden kann so der Unterschied zwischen einer Apherese zum Maximum- und Minimumzeitraum miteinander verglichen werden:

Gedankenexperiment 1 :

Nimmt man einen Patienten an, dessen Mobilisierungskinetik dem Durchschnittsverlauf der CD34+ Zellkonzentration aller Patienten (Abb. 3.9, S. 64) entspricht – ein Durchschnittspatient aller hier vorgenommenen Messungen also - , so ergibt sich für einen Sammelzeitraum um Stunde 10 (Maximum) eine durchschnittliche CD34+ Zellkonzentration, ca. 35% höher ist als zur Stunde 2 oder Stunde 6 nach G-CSF-Gabe.

Gedankenexperiment 2:

Betrachtet man nun den Patienten mit den stärksten Schwankungen der CD34+ Zellkonzentration innerhalb des Kollektivs, namentlich Patient 8, so zeigt sich ein relativer Unterschied von 253% zwischen der Minimalkonzentration 2 h nach G-CSF (40 CD34+ Zellen/ μ l) und der Maximalkonzentration ca. 10 Stunden nach G-CSF (141 CD34+ Zellen/ μ l).

Gedankenexperiment 3:

Selbst beim Patienten mit den geringsten Schwankungen zwischen Maximalkonzentration (286 CD34+/ μ l nach 7h) und Minimalkonzentrationen (203 CD34+/ μ l zum Zeitpunkt 0) darf von einem relativen Unterschied von ca. 40% ausgegangen werden.

In jedem dieser Fälle dürfen bei einer höheren Stammzellkonzentration im Blut auch höhere Aphereseausbeuten bei sonst gleichen Parametern erwartet werden. Dies

kann bedeuten, dass die Anzahl der Aphereseen insgesamt, aber auch das Durchlaufvolumen oder die Apheresezeit vermindert werden könnte, falls der Apheresezeitpunkt richtig gewählt ist. Denkbar wären nur zwei anstatt drei Aphereseen durchführen zu müssen (entspricht der 35% höheren Konzentration an Stammzellen im peripheren Blut aus Gedankenexperiment 1). Daraus wiederum folgt eine geringere Belastung für den Patienten, eine Senkung des aus einer Aphereseerisikos, und nebenbei eine Reduzierung von Kosten- und Personalaufwand.

Eingeschränkt wird diese Überlegung vor allem durch zwei Fakte: Das Ausmaß, in dem die zirkadiane Rhythmik der endogenen G-CSF-Ausschüttung in das Monitoring hineinspielt, bzw. inwiefern diese durch das exogene G-CSF ausgeschaltet wird, ist noch nicht ausreichend durch Studien erforscht. Zum anderen ist nicht klar, ob nach einer zwölfstündigen Messung der CD34+ Konzentrationsdynamik eine Aussage über die folgenden zwölf Stunden in Bezug auf Minimal- und Maximalwerte zulässig ist. Diese Frage zu beantworten wäre jedoch schwierig, dass die Apherese selbst einen solch immensen Einfluß auf die Ausschüttung der CD34+ Zellen ins periphere Blut nach sich zieht, dass eine Messung der Grunddynamik durch die G-CSF-Gabe kaum möglich wäre.

4.4 Zusammenfassende Beantwortung der Fragestellungen , Teil 2

Zu Frage 4

Wie kann ein Stammzellmonitoring vor Leukapherese durchgeführt und optimiert werden? Welche Messpunkte beim einzelnen Patienten sind nötig bzw. ausreichend, um einen optimalen Leukapheresezeitpunkt zu bestimmen?

Ein Stammzellmonitoring vor Leukapherese muss einen Ausgangswert zur Stunde 0 beinhalten. Eine Zuordnung zu einem der beiden Mobilisierungstypen (initialer Anstieg oder Abfall der CD34+ Zellzahlen nach G-CSF-Gabe) gelingt nur, wenn eine Messung ca. 2 Stunden nach G-CSF-Bolus integriert ist. Als dritter wichtiger Messpunkt ist eine CD34+ Konzentrationsbestimmung nach ca. 8 Stunden (evt. geschlechtsangepasst) anzusehen, da hier im Durchschnitt bei den Patienten eine Maximalkonzentration zu verzeichnen war. Eine weitere Messung zum Ende des Monitoring könnte die Aussage über den Verlauf der Mobilisierung sinnvoll ergänzen.

Zu Frage 5

Wie ist der potentielle Benefit für den Patienten aus den gewonnenen Daten einzuschätzen?

Eine statistisch hinreichende Aussage über einen Benefit ist bei der geringen Patientenzahl und ohne „Verblindung“ der Studie nicht möglich. Jedoch ist – unter Voraussetzung einer in der gängigen Literatur beschriebenen Abhängigkeit zwischen CD34+ Zellkonzentration im Blut und dem Aphereseerfolg – ein zusätzliches Apheresepotential in der Differenz zwischen Minimal- und Maximalwerten von über 30% denkbar.

5. Zusammenfassung

Die autologe Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen im Rahmen einer Hochdosis-Chemotherapie hat sich inzwischen bei der Behandlung von Tumoren im Kindesalter etabliert. Dabei blieb der optimale Zeitpunkt der Apherese von der CD34+ hämatopoetischen Stammzellen im peripheren Blut der Kinder, bezogen auf die Stunden am Tag der geplanten Stammzellsammlung, bisher unbeleuchtet. Insbesondere für pädiatrische Patienten liegen keine Untersuchungen zur dieser Problematik vor, deren Lösung jedoch den Erfolg einer Stammzellapherese verbessern könnte.

Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Mobilisierung der CD34+ Stammzellen im peripheren Blut unter dem Einfluß von G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) in Form eines klinischen Monitoring darzustellen. Dies erfolgte mit Hilfe der durchflusszytometrischen Messung CD45+/CD34+ Zellen aus dem peripheren Blut der Patienten nach G-CSF-Stimulation mit regelmäßigen Blutentnahmen über einen Zeitraum von 12 Stunden.

Untersucht wurden 14 Patienten der Klinik III der Universitäts-Kinderklinik Frankfurt mit unterschiedlichen malignen Erkrankungen (8x Neuroblastom, 2x Osteosarkom, NHL, PNET, Ewing-Sarkom, RMS). Dabei wurden im Abstand von 0,2,4,5,6,7,8,10 und 12 Stunden nach einer subcutanen G-CSF-Gabe (Dosis 4,8 bis 10,2 µg/kg/d) EDTA-Blutproben über einen zentralen Venenkatheder entnommen, und daraus ein automatisches Blutbild sowie eine durchflusszytometrische Bestimmung der Konzentration an CD34/45 positiven Zellen durchgeführt. Mit Hilfe dieser Bestimmung konnte nachgewiesen werden, dass die CD34/45 positiven Zellen über die 12 Stunden des Beobachtungszeitraumes individuell unterschiedliche Verläufe bieten. Zudem konnten alle Patienten zwei unterschiedlichen Initialkinetiken - den Mobilisierungstypen I und II - zugeordnet werden, welche sich durch einen initialen Anstieg bzw. einen initialen Abfall der CD34+ Zellkonzentration unterscheiden. Der optimale Zeitpunkt der Apherese - repräsentiert durch ein CD34+ Zellkonzentrationsmaximum im peripheren Blut - konnte für das untersuchte Patientenkollektiv mit ca. 8 Stunden nach G-CSF Bolus beschrieben werden. Dabei konnte weder der Verlauf der Gesamtleukozyten noch andere hämatologische Parameter aufgrund eines signifikant ähnlichen Verlaufes als Indikator für den Verlauf der CD34+ Zellmobilisierung genutzt werden. Signifikante Hinweise auf Zusammenhänge zwischen dem Verlauf der CD34+ Zellmobilisierung und den Grunderkrankungen, dem Alter, dem Geschlecht oder der Mobilisierungsart gab es nicht. Es stellte sich jedoch eine Tendenz zur Mobilisierung vom Typ I bei Kindern unter 3 Jahren dar. Eine Optimierung der Stammzellapherese kann durch zusätzliche CD34+Zellkonzentrationsbestimmungen erwartet werden, die Aufschluss über den Mobilisierungstyp geben und somit helfen, den optimalen Sammelzeitpunkt zu bestimmen. Messungen zum Zeitpunkt 0,2 und 8 Stunden nach G-CSF-Bolus erscheinen als besonders aufschlussreich.

Durch Beachtung der Maximal- und Minimalkonzentrationen der individuellen Verläufe können Apheresen zu optimalen Zeitpunkten durchgeführt werden, was zu einer Verbesserung der Aphereseausbeute und damit zu einer Senkung der Belastungen und Risiken für den Patienten führen. Die hier untersuchte, sehr inhomogene und zahlenmäßig kleine Patientengruppe hat jedoch auch gezeigt, dass größere Studien mit mehr Patienten notwendig sind, um statistisch signifikante Aussagen treffen zu können.

Summary

Autologous stem cell transplantation following high-dose chemotherapy has become an well established procedure in treatment of childhood malignancies. The optimum timing of apheresis of CD34+ hematopoietic stem cells – regarding to the hours on the day of apheresis, has not yet been found. Especially in childhood malignancies, solutions to optimize the timing of stem cell apheresis have to be found to reduce burdens and risks for the patients.

Aim of this study was to perform a clinical CD34+ stem cell monitoring in the peripheral blood to describe the influence of G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) on stem cell mobilization kinetics. The monitoring was performed by flowcytometric measurement of CD45+/CD34+ double positive cells in the peripheral blood of patients after, lasting 12 hours after a subcutaneous bolus of G-CSF. The monitoring included 14 patients of Clinic III of the University Children Hospital Frankfurt with different malignant diseases (8x Neuroblastoma, 2x osteosarcoma, Non-Hodgkin lymphoma, PNET, Ewing sarcoma, RMS). EDTA Blood samples for automatic blood cell count and flowcytometric CD45/34+ cell measurement were collected at 0,2,4,5,6,7,8,10 und 12 hours after subcutaneous G-CSF-bolus (doses of 4,8 bis 10,2 µg/kg/d).

Although varying individual kinetics of CD45/34+ cells within 12 hours of monitoring were detected in all patients, two basic tendencies were found for mobilization kinetics: patients with initial increase of CD34+ cell concentration (pattern of mobilization I, POM I), and patients with initial decrease of CD34+ cell concentration (pattern of mobilization II, POM II). Optimum timing for apheresis – showing highest average CD34+ cell concentration - for these fourteen patients was about 8 hours after G-CSF-Bolus. Analysing leukocyte cell count and other hematological parameters, no significant prediction parameter for CD34+ cell mobilization and increase could be detected. No significant correlations between CD34+ mobilization kinetics and malignant disease, age, sex of patient or kind of mobilization was found. As a tendency, children below the age of 3 years did all show a POM I.

Optimization of stem cell apheresis can be expected after additionally CD34+ stem cell concentration measurements to register the pattern of mobilization, finding an optimum time for apheresis. Measurement at 0,2 and 8 hours after G-CSF bolus seem to help predicting the pattern of mobilization. Therefore, finding maximum and minimum concentration in patients mobilization kinetic could result in higher yield of apheresis and a reduction of stress and risks for the patients. Anyway, other studies with a larger, less inhomogeneous group of patients are needed to show statistically significant results.

6. Anhang

- A) **Abkürzungsverzeichnis**
- B) **Übersicht der verwendeten Cluster of Differentiation-Kurzbezeichnungen**
- C) **Individualdaten**

A) Abkürzungsverzeichnis

#	Nummer
Σ	Summe
	Amine and precursor uptake and decarboxylation
APUD	
BE	Blutentnahme
CD	Cluster of Differentiation
	Tag (lat. dies)
d	
DC	Dendritische Zellen
dDa	Kilo Dalton
EBV	Eppstein-Barr-Virus
ELAM	Endothel-Leukozyten-Adhäsionsmolekül
EPO	Erythropoetin
	Granulocyte-colony stimulating factor
G-CSF	
GM	Geometrisches Mittel
GM-CSF	Granulocyte Monocyte-colony stimulation factor
h	Stunde (lat. horus)
HLA	Human Leucocyte Antigen
i.v.	Intravenös
IL	Interleukin
LAM	Leukozyten-Adhäsionsmolekül
Leukos	Leukozytenkonzentration
LPB	Lipopolysaccharid Binding Protein
Max	Konzentrationsminimum
M-CSF	Macrophage-colony stimulation factor
Min	Konzentrationsmaximum
MW	Mittelwert
NB	Neuroblastom
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
r	Korrelationskoeffizient
RMS	Rhabdomyosarkom
s.c.	Subcutan
SCF	Stem cell factor
Stabw	Standardabweichung
STAT	Singal Transducer and Acticator of Transcription
TH-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO/ MGDF	Thrombopoetin
VLA	Very late appearing Antigen
KL	Körperlänge [cm]
kgKG	Körpergewicht [kg]
KOF	Körperoberfläche [m ²]
BMI	Body Mass Index [kg/m ²]
BE	Blutentnahme
m	Männlich
w	Weiblich

B) Übersicht der verwendeten Cluster of Differentiation-Kurzbezeichnungen

CD4	Thymozyten, TH ₁ - und TH ₂ Zellen, Monozyten, Makrophagen	55	Corezeptor für MHC-Klasse-II-Moleküle
CD10	B-/T- Vorläuferzellen, Knochenmarkstromazellen	100	Zink-Metalloproteinase
CD11a	Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen	180	Integrin LFA-1-Untereinheit
CD11c	Myeloide Zellen	150	Integrin CR4-Untereinheit
CD14	Myelomonozytische Zellen	53-55	LBP-Rezeptor
CD15	Neutrophile u. eosinophile Zellen, Monozyten		Endständiges Trisaccharid an Glykoproteinen/Glykolipiden
CD16	Neutrophile Zellen, NK-Zellen	50-80	FcγRIII-Untereinheit
CD18	Leukozyten	95	Integrin-Untereinheit β ₂
CD19	B-Zellen	95	Komplexbilnder mit CD21 u. CD81
CD20	B-Zellen	33-37	Evt. Ca ²⁺ -Kanal-Untereinheit
CD21	Reife B-Zellen, dentrittische Zellen	145	EBV – u. C3d-Komplementrezeptor
CD28	T-Zellen, aktivierte B-Zellen	44	Costimulation CD80 u. CD86
CD34	Hämatopoetische Vorläuferzellen Kapillarendothel	105- 120	CD62L-Ligand
CD43	Leukozyten (außer: ruhende B-Zellen)	95- 135	Evt. antiadhäsive Wirkung
CD45	Alle hämatopoetischen Zellen	180- 240	Tyrosinphosphatase
CD45RA	T- u. B-Zellsubpopulationen, Monozyten	205- 220	Isoform von CD45 mit A-Exon
CD45RO	T- u. B-Zellsubpopulationen, Monozyten, Makrophagen	180	Isoform von CD45 die werder das A- noch B- oder C-Exon enthält
CD62E	Endothel	140	Endothel- Leukozytenadhäsionsmolekül (ELAM)
CD62L	Nk-, B- u. T-Zellen, Monozyten,	150	Leukozytenadhäsionsmolekül (LAM)
CD71	Alle proliferierenden Zellen	95	Transferrinrezeptor
CD80	B-Zell-Subpopulationen	60	CD28-Ligand
CD81	Lymphozyten	26	Bildet mit CD19 und CD21 B-Zell-Corezeptor
CD86	Monozyten, aktivierte B-Zellen, dentritische Zellen	80	ILT/LIR-Familie
CD133	Stamm-/Vorläuferzellen		Auch AC133

(Nach: Janeway CA et al 2002)

Patient 1

Geburtsdatum: 27.06.1998
 Untersuchungstag: 09.06.2000
 Alter bei Untersuchung: 1 11/12 Jahre

Geschlecht: weiblich
 Gewicht: 9,8 kg
 Größe: 82 cm
 KOF: 0,47 m²

Beginn der Untersuchung: 16:00 Uhr
 Ende der Untersuchung: 04:00 Uhr

Diagnose: Neuroblastom
 Erstaufnahme: 28.02.2000
 Behandlung nach: NB97

Stimulationstage vor Monitoring: 17
 Vorherige Leukapheresen: 0
 Modus der Gabe: sub cutan

G-CSF/d: 480 µg

Ergebnisse

Leukozyten	*10 ³ /µl	22,10	26,30	30,20	30,40	31,90	25,50	33,50	34,80	38,10
Erythrozyten	*10 ⁶ /µl	4,36	4,25	4,15	4,08	4,01	3,17	4,01	3,96	3,99
Hb	g/dL	12,80	12,20	11,90	11,80	11,70	9,00	11,60	11,30	11,50
Hämatokrit	%	37,60	36,50	35,70	34,80	34,40	27,40	33,90	34,20	34,00
MCV	fL	86,30	85,80	86,10	85,30	85,80	86,50	84,60	86,30	85,10
MCH	pg	29,40	28,70	28,70	28,90	29,20	28,40	28,90	28,50	28,80
MCHC	g/dL	34,00	33,40	33,30	33,90	34,00	32,80	34,20	33,00	33,80
RDW	%	16,80	17,30	16,30	16,50	16,70	17,20	16,60	17,30	17,50
Thrombozyten	*10 ³ /µl	30,00	30,00	35,00	35,00	32,00	23,00	30,00	29,00	34,00
Lymphozyten	%	19,50	23,30	21,70	20,30	17,80	22,70	18,20	20,40	17,00
MID	%	9,60	7,80	7,30	6,80	8,40	6,80	11,30	8,50	9,30
Granulozyten	%	70,90	68,90	71,00	72,90	73,80	70,50	70,50	71,10	73,30
Lymphozyten	*10 ³ /µl	4,30	6,10	6,60	6,20	5,70	5,80	6,10	7,10	6,50
MID	*10 ³ /µl	2,10	2,10	2,20	2,10	2,70	1,70	3,80	3,00	3,50
Granulozyten	*10 ³ /µl	15,70	18,10	21,40	22,20	23,50	18,00	23,60	24,70	28,10
Total Counts										
CD45+ (1)	Σ	35527	21745	26576	20136	24714	23667	25459	20790	42810
CD45+ (2)	Σ	25914	25522	26517	25729	23366	25178	21099	19955	20236
CD45+ (3)	Σ	21042	22516		27364	29858	53214	27985	26181	23030
CD34+ (3)	Σ	93	48	70	86	70	81	78	53	108
CD34+ (1)	Σ	56	59	63	95	57	85	57	60	50
CD34+ (2)	Σ	51	56		97	94	118	53	62	34
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,26	0,22	0,26	0,43	0,28	0,34	0,31	0,25	0,25
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,22	0,23	0,24	0,37	0,24	0,34	0,27	0,30	0,25
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,24	0,25		0,35	0,31	0,22	0,19	0,24	0,15
CD34 abs(1)	Σ	58	58	80	130	90	87	103	89	96
CD34 abs(2)	Σ	48	61	72	112	78	86	91	105	94
CD34 abs(3)	Σ	54	65		108	100	57	63	82	56
Mittelwert		53,06	61,42	75,65	116,62	89,53	76,64	85,53	91,92	82,17

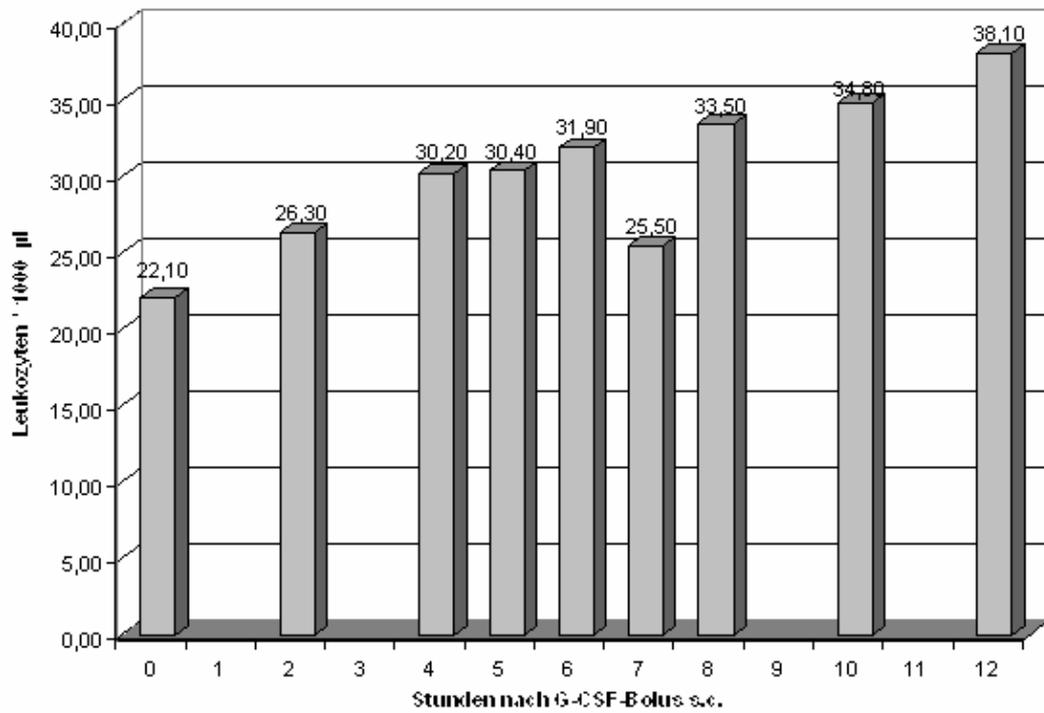
Leukozytenkonzentration

Minimum:	22,1 * 10 ³ /µl	(nach 0 h)	Maximum:	38,1 * 10 ³ /µl	(nach 12 h)
Δ Max/Min abs:	16 * 10 ³ /µl		Δ Max/Min rel.:	72 %	
Δ Vor/Nach abs:	16 * 10 ³ /µl		Δ Vor/Nach rel.:	72 %	

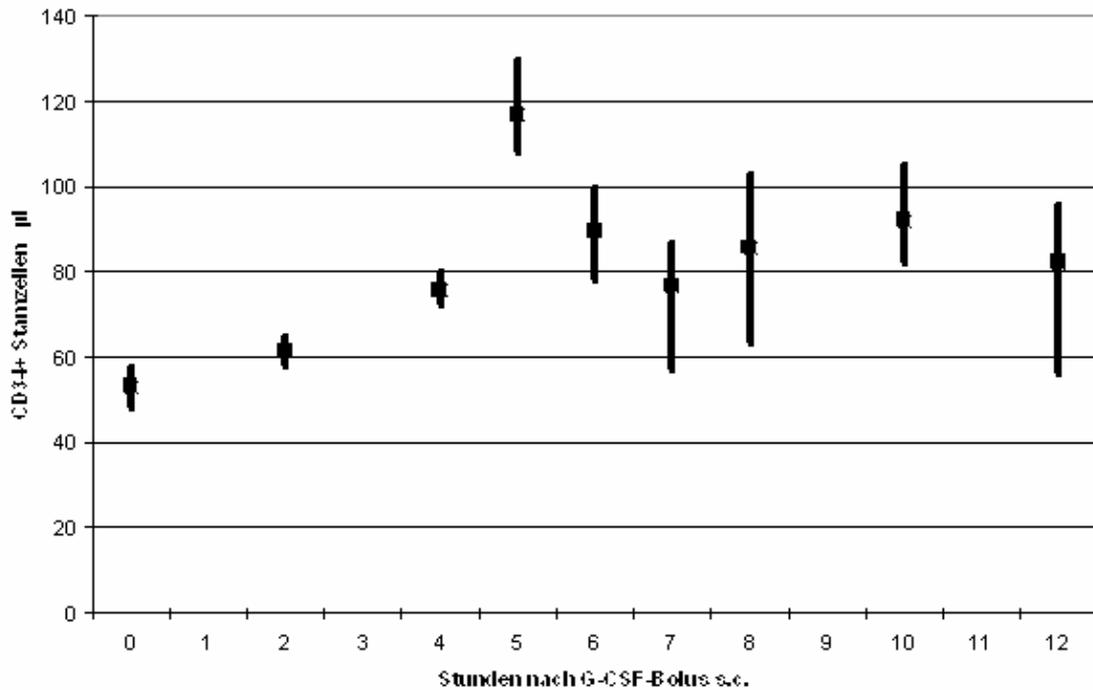
CD34+ Zellkonzentration

Minimum:	53 / µl	(nach 0 h)	Maximum:	117 / µl	(nach 5 h)
Δ Max/Min abs:	64 / µl		Δ Max/Min rel.:	118 %	
Δ Vor/Nach abs:	29 / µl		Δ Vor/Nach rel.:	54 %	

Monitoring der Leukozytenkonzentration
bei Patient 1 im zeitlichen Verlauf über 12 Stunden



Konzentration der CD34+ Stammzellen im peripher venösen Blut
von Patient 1 unter dem Einfluß von G-CSF



Patient 2

Geburtsdatum: 30.04.1995
 Untersuchungstag: 06.09.1998
 Alter bei Untersuchung: 3 6/12 Jahre

Geschlecht: weiblich
 Gewicht: 12,5 kg
 Größe: 98 cm
 KOF: 0,58 m²

Beginn der Untersuchung: 09:15 Uhr
 Ende der Untersuchung: 18:20 Uhr

Diagnose: Neuroblastom
 Erstdiagnose: 20.04.1998
 Behandlung nach: NB97

Stimulationstage vor Monitoring: 13
 Vorherige Leukapheresen: 2
 Modus der Gabe: sub cutan

G-CSF/d: 150 µg

Bemerkungen und Besonderheiten zum Verlauf des Monitoring:

Die Patientin ist während der ganzen Zeit motiviert, aktiv und kooperativ. Mittagsschlaf zwischen 14:30 und 15:30. Abbruch der Messungen nach 9 Stunden auf Wunsch der Eltern. Bei den Blutbildmessungen erfolgt eine Gegenprüfung mit einem zweiten Gerät, das identische Ergebnisse liefert.

Ergebnisse

Leukozyten	*10 ³ /µl	4,6	4,1	4,6	5,1	4,2	4,1	5,4	6,0	6,3
Erythrozyten	*10 ⁶ /µl	2,99	2,79	2,7	2,86	2,69	3,12	2,72	2,73	2,66
Hb	g/dL	9,1	8,4	8,1	8,3	8,1	9,3	8,0	8,1	7,9
Hämatokrit	%	26,3	24,6	23,7	25,2	23,4	27,5	23,7	23,8	23,4
MCV	fL	88	88	87	88	87	88	87	87	88
MCH	pg	30,4	30,1	29,8	29,0	30,1	29,8	29,4	29,7	29,7
MCHC	g/dL	34,6	34,1	34,2	32,9	34,6	33,8	33,8	34,0	33,8
RDW	%	15,6	16,6	15,4	15,6	16,9	15,5	15,6	16,9	15,4
Thrombozyten	*10 ³ /µl	7	7	15	11	9	6	8	35	11
Lymphozyten	%	15,3	21,4	19,7	21,4	19,2	17,2	18,1	19,2	17,5
MID	%	9,6	10,2	10,5	9,9	10,6	9,2	8,8	9,4	9,3
Granulozyten	%	75,1	68,4	69,8	68,7	70,2	73,6	73,1	71,4	73,2
Lymphozyten	*10 ³ /µl	0,7	0,9	0,9	1,1	0,8	0,7	1,0	1,2	1,1
MID	*10 ³ /µl	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5	0,6	0,6
Granulozyten	*10 ³ /µl	3,5	2,8	3,2	3,5	2,9	3,0	3,9	4,3	4,6
Total Counts:										
CD45+ (1)	∑	25446	18317	30468	30169	29221	87024	25602	30988	19027
CD45+ (2)	∑	20065	18911	23253	30336	40011	21022	29685	18058	31468
CD45+ (3)	∑	26494					34705			
CD34+ (1)	∑	64	58	69	72	58	187	59	60	56
CD34+ (2)	∑	65	54	61	56	114	56	52	53	69
CD34+ (3)	∑	64					63			
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,252	0,317	0,226	0,239	0,198	0,215	0,23	0,19	0,29
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,324	0,286	0,262	0,185	0,285	0,266	0,18	0,29	0,22
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,242					0,182			
CD34 abs(1)	∑	12	13	10	12	8	9	12	12	19
CD34 abs(2)	∑	15	12	12	9	12	11	9	18	14
CD34 abs(3)	∑	11					7			
Mittelwert		12,52	12,34	11,24	10,79	10,15	9,058	10,95	14,61	16,18

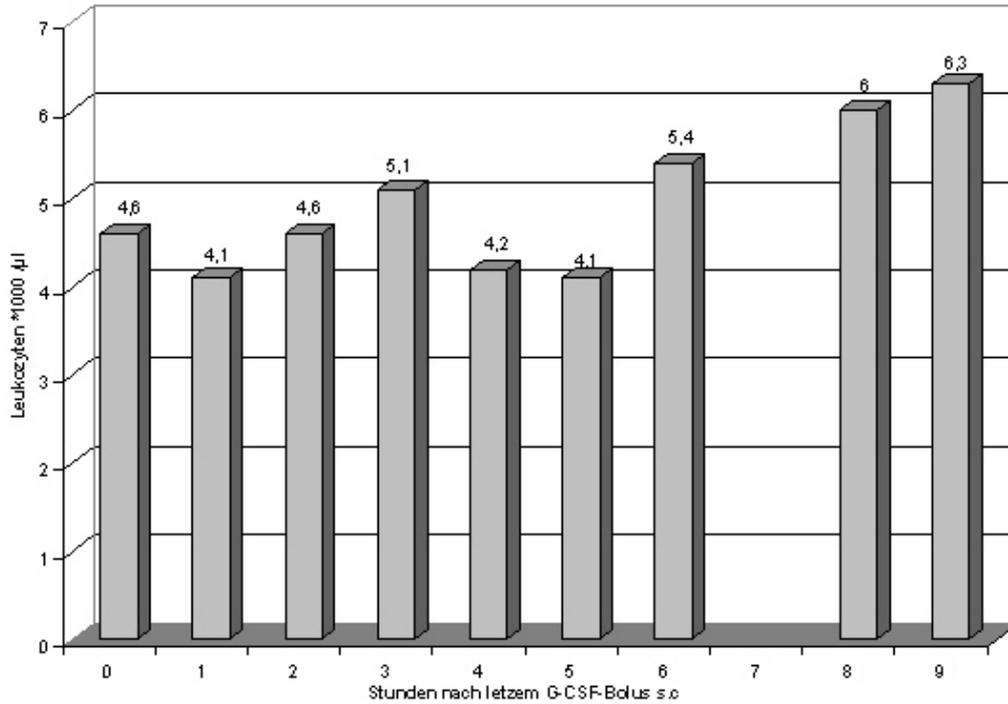
Leukozytenkonzentration

Minimum: 4,1 * 10³ /µl (nach 1 h und 5 h) Maximum: 6,3 * 10³ /µl (nach 9 h)
 Δ Max/Min abs: 2,2 * 10³ /µl Δ Max/Min rel.: 53 %
 Δ Vor/Nach abs: 1,7 * 10³ /µl Δ Vor/Nach rel.: 36 %

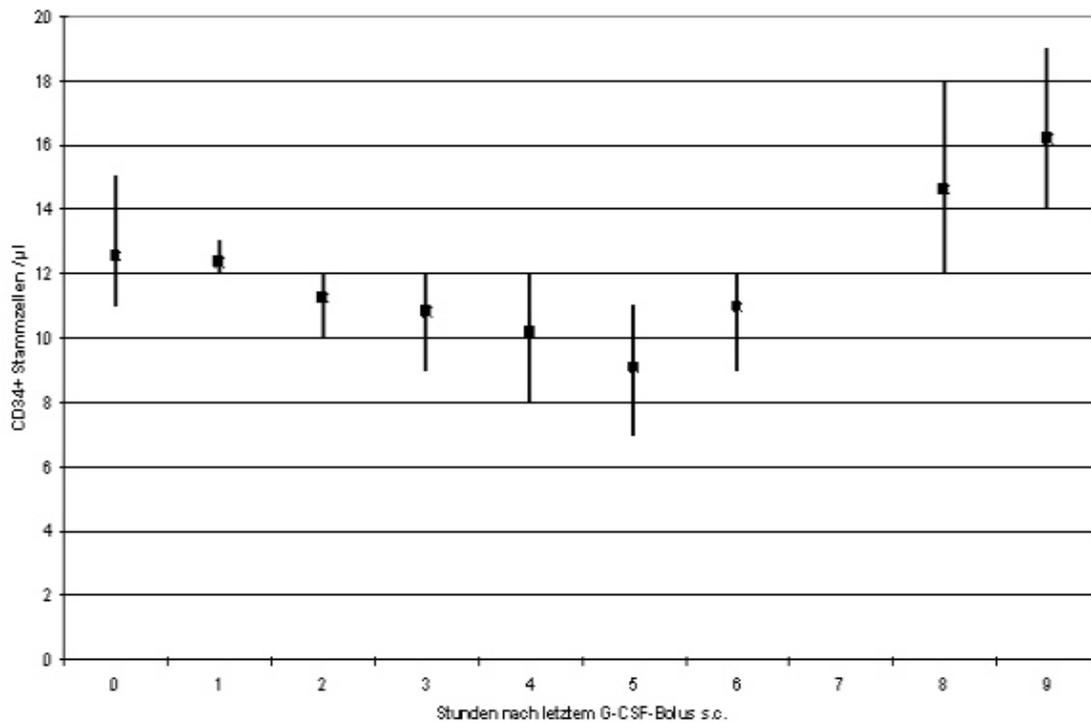
CD34+ Zellkonzentration

Minimum: 9 / µl (nach 5 h) Maximum: 16 / µl (nach 9 h)
 Δ Max/Min abs: 6 / µl Δ Max/Min rel.: 66 %
 Δ Vor/Nach abs: 4 / µl Δ Vor/Nach rel.: 32 %

Monitoring der Leukozytenkonzentration
 bei Patient 2 im zeitlichen Verlauf über 9 Stunden



Konzentration der CD34+ Stammzellen im venösen Blut
 bei Patient 2 unter dem Einfluß von G-CSF



Patient 3

Geburtsdatum:	24.08.1981	Geschlecht:	weiblich
Untersuchungstag:	09.11.1998	Gewicht:	68 kg
Alter bei Untersuchung:	17 3/12 Jahre	Größe:	168 cm
		KOF:	1,78 m ²
Beginn der Untersuchung:	15:20 Uhr	Diagnose:	PNET
Ende der Untersuchung:	03:00 Uhr	Erstaufnahme:	05.08.1998
		Behandlung nach:	CWS 96
Stimulationstage vor Monitoring:	5 Tage	G-CSF/d:	480 µg
Vorherige Leukapheresen:	3		
Modus der Gabe:	sub cutan		

Bemerkungen und Besonderheiten zum Verlauf des Monitoring:
 Die Patientin ist kooperativ, von der vorhergehenden Leukapherese aber noch sehr belastet. Sie geht um 22 Uhr schlafen, wird aber zu den Messungen geweckt. Aufgrund eines Funktionsfehlers des Blutzählgerätes kann ein Teil der sonst erhobenen Daten bezüglich des Blutbildes nicht erfasst werden.

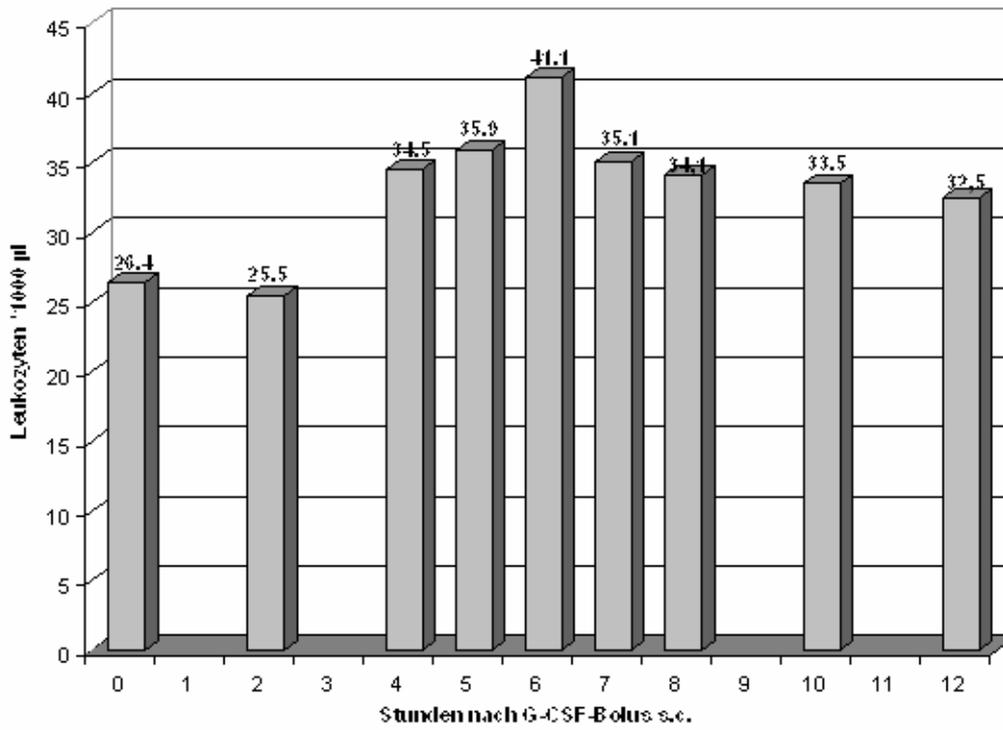
Ergebnisse

Leukozyten	*10 ³ /µl	26,4	25,5	34,5	35,9	41,1	35,1	34,1	33,5	32,5
Erythrozyten	*10 ⁶ /µl	3,36	3,55	3,27	3,26	3,57	3,05	3,08	3,04	3,07
Hb	g/dL	9,6	10,1	9,3	9,3	10,3	8,8	8,8	8,8	8,8
Hämatokrit	%	29,6	31,2	28,8	28,7	31,4	26,8	27,1	27,1	27,3
MCV	fL	88	88	88	88	88	88	88	89	89
MCH	pg	28,6	28,5	28,4	28,5	28,9	28,9	28,6	28,9	28,7
MCHC	g/dL	32,4	32,4	32,3	32,4	32,8	32,8	32,5	32,5	32,2
RDW	%	18,1	19,3	19,5	19,7	19	18,2	18,6	18,8	19,2
Thrombozyten	*10 ³ /µl	121	131	129	134	154	119	109	126	114
Lymphozyten	%	10,8					8,4	8,5	9,1	8,6
MID	%	3,8					5,1	4,8	2,9	3,7
Granulozyten	%	85,4					86,5	86,7	88	87,7
Lymphozyten	*10 ³ /µl	2,9					2,9	2,9	3	2,8
MID	*10 ³ /µl	1					1,8	1,6	1	1,2
Granulozyten	*10 ³ /µl	22,5					30,4	29,6	29,5	28,5
Total Counts										
CD45+ (1)	∑	50028	37187	79961	50494	51124	49230	45400	63332	95689
CD45+ (2)	∑	30848	38290	79961	65573	68843	66934	54789	68248	108039
CD34+ (1)	∑	81	51	53	53	50	51	55	50	53
CD34+ (2)	∑	49	52	53	64	50	51	50	50	51
Anteil an Leukozyten (1)	%	0,16	0,14	0,07	0,10	0,10	0,10	0,12	0,08	0,06
Anteil an Leukozyten (2)	%	0,16	0,14	0,07	0,10	0,07	0,08	0,09	0,07	0,05
CD34 abs(1)	∑	42,74	34,97	22,87	37,68	40,20	36,36	41,31	26,45	18,00
CD34 abs(2)	∑	41,93	34,63	22,87	35,04	29,85	26,74	31,12	24,54	15,34
Mittelwert		42,3	34,80	22,87	36,36	35,02	31,55	36,21	25,50	16,67

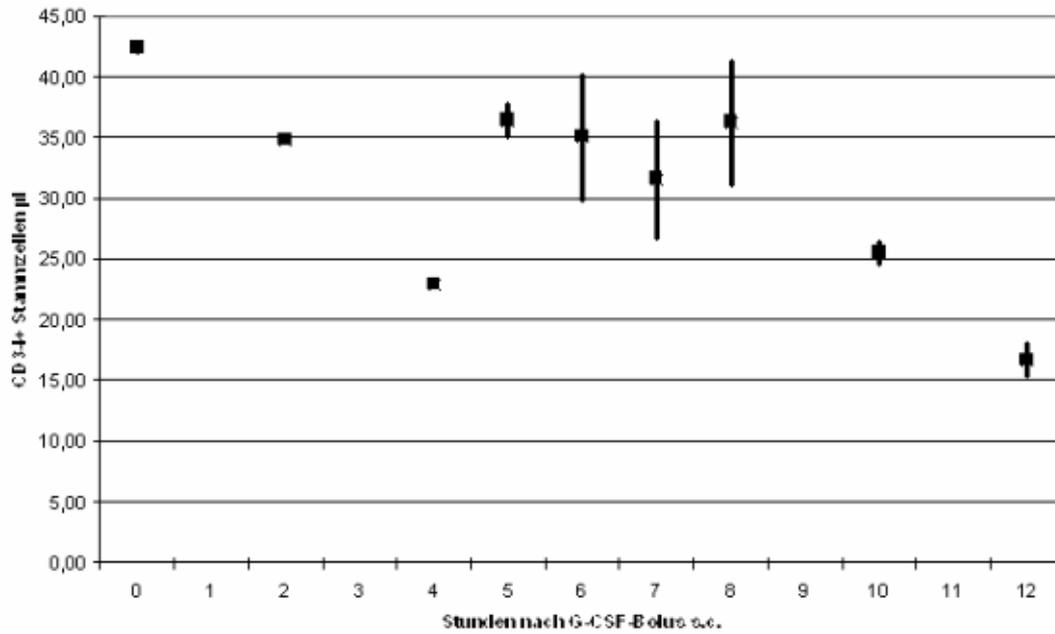
Leukozytenkonzentration			
Minimum:	25,5 * 10 ³ /µl	(nach 2 h)	Maximum: 41,1 * 10 ³ /µl (nach 6 h)
Δ Max/Min abs:	15,6 * 10 ³ /µl		Δ Max/Min rel.: 61 %
Δ Vor/Nach abs:	8,3 * 10 ³ /µl		Δ Vor/Nach rel: 31,4 %

CD34+ Zellkonzentration			
Minimum:	23 /µl	(nach 4 h)	Maximum: 36 / µl (nach 5 h)
Δ Max/Min abs:	13 /µl		Δ Max/Min rel.: 57 %
Δ Vor/Nach abs:	-17 /µl		Δ Vor/Nach rel: 40 %

Monitoring der Leukozytenkonzentration
 bei Patient 3 im zeitlichen Verlauf über 12 Stunden



Konzentration der CD 34+ Stammzellen im peripher venösen Blut
 von Patient 3 unter dem Einfluß von G-CSF



Patient 4

Geburtsdatum: 27.04.1987
 Untersuchungstag: 27.02.1999
 Alter bei Untersuchung: 12 1/12 Jahre

Geschlecht: weiblich
 Gewicht: 47 kg
 Größe: 1,51 cm
 KOF: 1,4 m²

Beginn der Untersuchung: 15:50 Uhr
 Ende der Untersuchung: 03:50 Uhr

Diagnose: Osteosarkom
 Erstaufnahme: 04.1997
 Behandlung nach: COSS 96

Stimulationstage vor Monitoring: 10
 Vorherige Leukapheresen: 0
 Modus der Gabe: sub cutan

G-CSF/d: 480 µg

Ergebnisse

Leukozyten	*10 ³ /µl	3,3	4,8	6,5	7,5	7,9	8,8	10,0	12,3	14,5
Erythrozyten	*10 ⁶ /µl	3,2	4,8	6,1	7,4	7,7	8,7	9,7	12,6	13,2
Hb	g/dL	2,57	2,93	3,00		3,10	3,19	3,55	3,64	3,33
Hämatokrit	%	6,90	7,70	7,80	7,80	8,70	9,2	9,40	9,90	9,4
MCV	fL	19,80	22,60	23,10		24,20	24,9	27,70	28,40	25,6
MCH	pg	77,00	77,00	77,00		78,00	78	78,00	78,00	77
MCHC	g/dL	26,80	26,30	26,00		28,10	28,8	26,80	27,20	28,2
RDW	%	34,80	34,10	33,80		36,00	36,9	33,90	34,90	36,7
Thrombozyten	*10 ³ /µl	18,40	17,70	17,60		16,80	17,2	18,10	17,80	18,2
Lymphozyten	%		22,60	18,90	17,10	15,70	11,9			7,3
MID	%		6,40	9,40	8,00	8,20	9,4			8,4
Granulozyten	%		71,00	71,70	74,90	5,90	78,8			84,3
Lymphozyten	*10 ³ /µl		1,10	1,20	1,30	1,20	1			1
MID	*10 ³ /µl		0,30	0,60	0,60	0,60	0,8			1,1
Granulozyten	*10 ³ /µl		3,40	4,40	5,50	76,10	6,8			11,1
Total Counts:										
CD45+ (1)	Σ	5264	10035	12124	4606	3158	7180	11342	8065	6155
CD45+ (2)	Σ	5496	7903	17760	6108	13959	7650	11670	10508	6333
CD45+ (3)	Σ	7250	8610	17957	9975	13959	9468	10334	10508	8975
CD34+ (1)	Σ	142	279	273	125	192	154	220	153	107
CD34+ (2)	Σ	132	215	312	117	189	157	154	140	110
CD34+ (3)	Σ	163	205	274	117	189	128	129	140	121
Anteil an Leukozyten (1)	%	2,70	2,78	2,25	2,71	6,08	2,14	1,94	1,90	1,74
Anteil an Leukozyten (2)	%	2,40	2,72	1,76	1,92	1,35	2,05	1,32	1,33	1,74
Anteil an Leukozyten (3)	%	2,25	2,38	1,53	1,17	1,35	1,35	1,25	1,33	1,35
CD34 abs(1)	Σ	89,02	133,45	146,36	203,54		188,75	193,97	233,34	252,07
CD34 abs(2)	Σ	79,26	130,58	114,19	143,66	106,96	180,60	131,96	163,88	251,86
CD34 abs(3)	Σ	74,19	114,29	99,18	87,97	106,96	118,97	124,83		195,49
Mittelwert		80,82	126,11	119,91	145,06	106,96	162,77	150,25	198,61	233,14

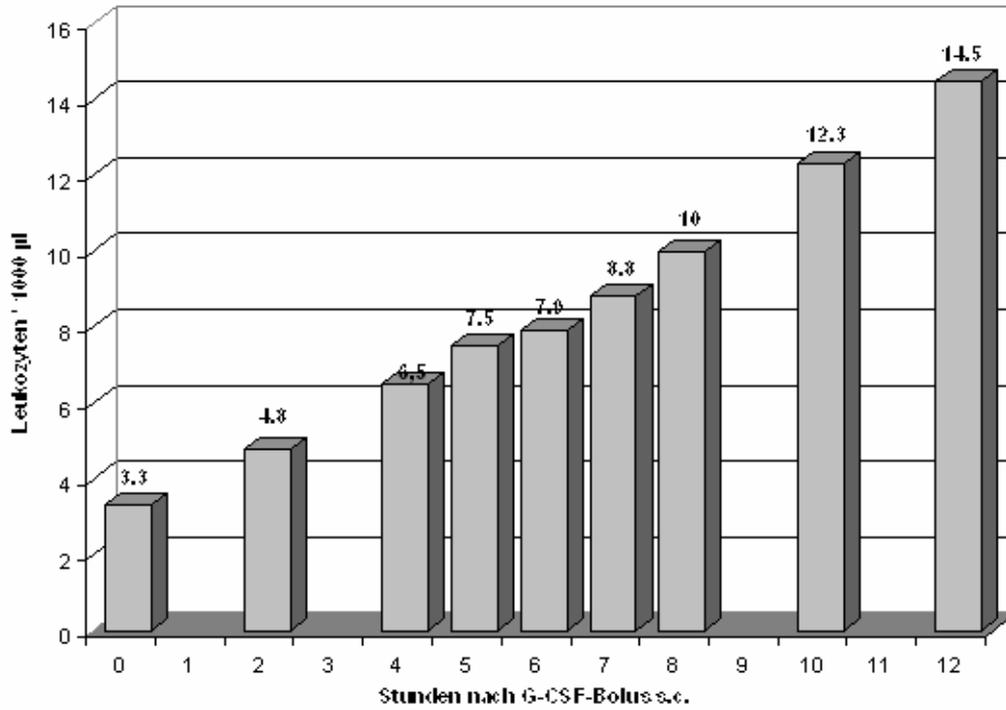
Leukozytenkonzentration

Minimum:	3,3 * 10 ³ /µl	(nach 0 h)	Maximum:	14,5 * 10 ³ /µl	(nach 12 h)
Δ Max/Min abs:	11,2 * 10 ³ /µl		Δ Max/Min rel.:	339 %	
Δ Vor/Nach abs:	11,2 * 10 ³ /µl		Δ Vor/Nach rel.:	339 %	

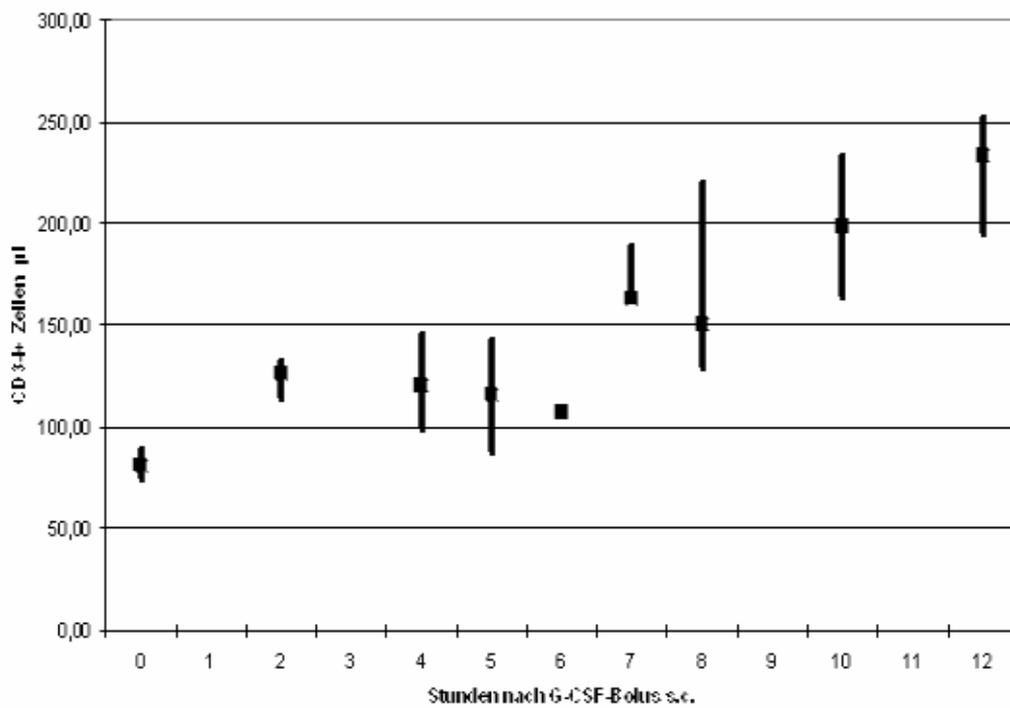
CD34+ Zellkonzentration

Minimum:	106 /µl	(nach 6 h)	Maximum:	233 /µl	(nach 12 h)
Δ Max/Min abs:	127 /µl		Δ Max/Min rel.:	120 %	
Δ Vor/Nach abs:	152 /µl		Δ Vor/Nach rel.:	143 %	

Monitoring der Leukozytenkonzentration
 bei Patient 4 im zeitlichen Verlauf über 12 Stunden



Konzentration der CD 34+ Stammzellen im peripher venösen Blut
 von Patient 4 unter dem Einfluß von G-CSF



Patient 5

GH000515

Geburtsdatum: 31.07.1999
 Untersuchungstag: 15.05.2000
 Alter bei Untersuchung: 10/12 Jahre

Geschlecht: weiblich
 Gewicht: 8,6 kg
 Größe: 72 cm
 KOF: 0,42 m²

Beginn der Untersuchung: 18:00 Uhr
 Ende der Untersuchung: 06:00 Uhr

Diagnose: Neuroblastom
 Erstaufnahme: 28.02.2000
 Behandlung nach: NB97

Stimulationstage vor Monitoring: 15
 Vorherige Leukapheresen: 0
 Modus der Gabe: sub cutan

G-CSF/d: 60 µg

Ergebnisse

Leukozyten	*10 ³ /µl	3,60	5,60	4,30	3,90	4,30	4,50	4,80	5,30	5,50
Erythrozyten	*10 ⁶ /µl	3,90	4,44	3,99	3,93	3,87	4,00	3,96	4,01	4,03
Hb	g/dL	10,40	12,10	10,70	10,50	10,30	10,70	10,70	10,70	10,80
Hämatokrit	%	30,80	35,30	31,40	30,90	30,20	31,10	30,80	31,80	31,50
MCV	fL	79,00	79,40	78,60	78,60	78,00	77,80	77,80	79,40	78,10
MCH	pg	26,70	27,30	26,80	26,70	26,60	26,80	27,00	26,70	26,80
MCHC	g/dL	33,80	34,30	34,10	34,00	34,10	34,40	34,70	33,60	34,30
RDW	%	17,70	17,20	17,80	17,10	17,70	16,00	16,80	17,40	18,10
Thrombozyten	*10 ³ /µl	15,00	19,00	17,00	22,00	16,00	19,00	21,00	17,00	17,00
Lymphozyten	%	47,10	45,50	40,20	41,60	43,20	41,70	35,80	43,60	32,40
MID	%	8,70	7,80	11,30	8,90	8,20	8,40	10,30	7,70	11,00
Granulozyten	%	44,20	46,70	48,50	49,50	48,60	49,90	53,90	48,70	56,60
Lymphozyten	*10 ³ /µl	1,70	2,50	1,70	1,60	1,90	1,90	1,70	2,30	1,80
MID	*10 ³ /µl	0,30	0,40	0,50	0,30	0,40	0,40	0,50	0,40	0,60
Granulozyten	*10 ³ /µl	1,60	2,60	2,10	1,90	2,10	2,20	2,60	2,60	3,10
Total Counts:										
CD45+ (1)	Σ	19810	23868	21543	22539	31628	21115	20697	19557	20083
CD45+ (2)	Σ	21547	22601	20047	20174	20522	21066	20731	20254	19993
CD45+ (3)	Σ	23043	20254	21781	19743	19236	20349	19491	19131	19570
CD34+ (1)	Σ	42	65	56	52	71	89	81	78	81
CD34+ (2)	Σ	44	42	51	61	61	76	67	88	69
CD34+ (3)	Σ	54	42	63	63	62	82	71	83	68
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,21	0,27	0,26	0,23	0,22	0,42	0,39	0,40	0,40
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,20	0,19	0,25	0,30	0,30	0,36	0,32	0,43	0,35
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,23	0,21					0,36	0,43	0,35
CD34 abs(1)	Σ	8	15	11	9	10	19	19	21	22
CD34 abs(2)	Σ	7	10	11	12	13	16	16	23	19
CD34 abs(3)	Σ	8	12					17	23	19
Mittelwert		8	12	11	10	11	18	17	22	20

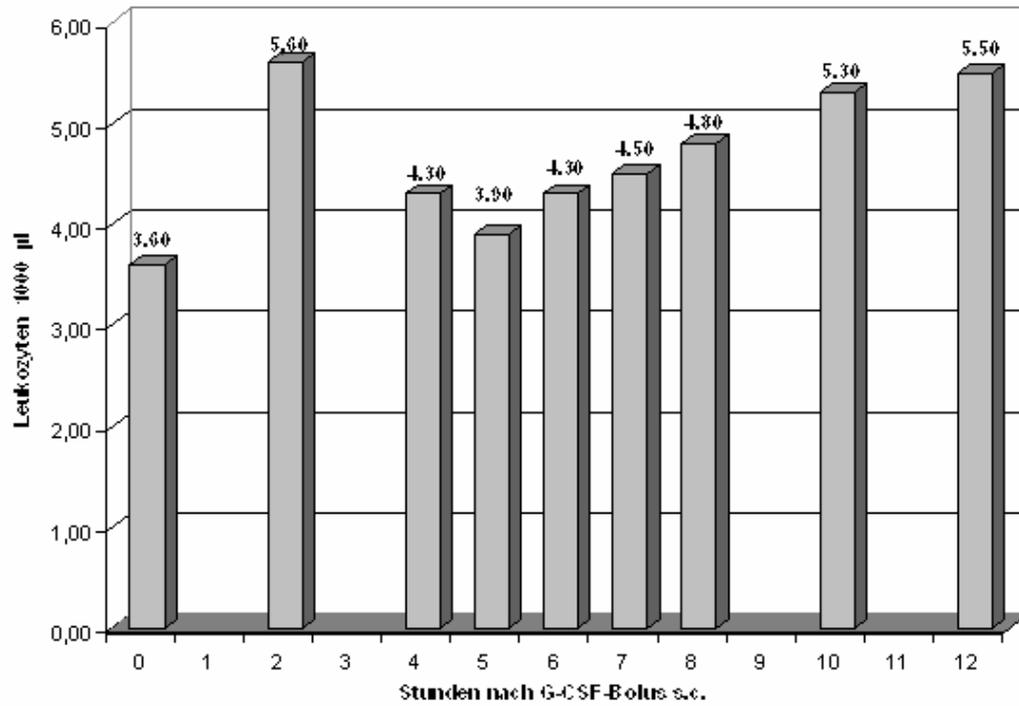
Leukozytenkonzentration

Minimum:	3,6 * 10 ³ /µl	(nach 0 h)	Maximum:	5,5 * 10 ³ /µl	(nach 12 h)
Δ Max/Min abs:	1,9 * 10 ³ /µl		Δ Max/Min rel.:	53 %	
Δ Vor/Nach abs:	1,9 * 10 ³ /µl		Δ Vor/Nach rel.:	53 %	

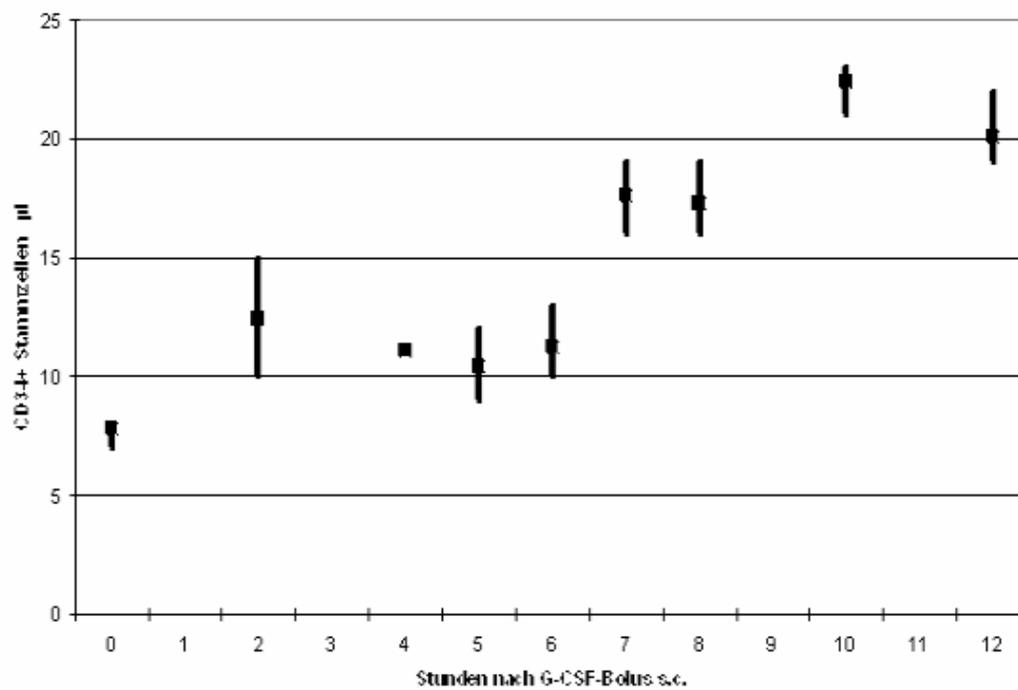
CD34+ Zellkonzentration

Minimum:	8 / µl	(nach 0 h)	Maximum:	22 / µl	(nach 10 h)
Δ Max/Min abs:	14 /µl		Δ Max/Min rel.:	175 %	
Δ Vor/Nach abs:	12 /µl		Δ Vor/Nach rel.:	150 %	

Monitoring der Leukozytenkonzentration
bei Patient 5 unter dem Einfluß von G-CSF



Konzentration der CD34+ Stammzellen im venösen Blut
von Patient 5 unter dem Einfluß von G-CSF



Patient 6

Geburtsdatum: 15.01.1996
 Untersuchungstag: 27.11.1998
 Alter bei Untersuchung: 1 10/12 Jahre

Geschlecht: weiblich
 Gewicht: 15 kg
 Größe: 105 cm
 KOF: 0,66 m²

Beginn der Untersuchung: 15:20 Uhr
 Ende der Untersuchung: 03:00 Uhr

Diagnose: Neuroblastom
 Erstaufnahme: 26.11.1998
 Behandlung nach: NB 97

Stimulationstage vor Monitoring: 5 Tage
 Vorherige Leukapheresen: 3
 Modus der Gabe: sub cutan

G-CSF/d: 150 µg

Ergebnisse Blutbild

Leukozyten	*10 ³ /µl	10,5	10,8	11,5	13,5	15,5	16,8	15,3	18,8	19,7	
Erythrozyten	*10 ⁶ /µl	2,95	2,96	2,87	2,93	2,86	3,05	3,23	3,11	2,96	
Hb	g/dL	9	9	8,7	9,00	8,8	9,3	9,8	9,4	8,8	
Hämatokrit	%	25,7	25,5	25	25,20	24,6	26,5	28,1	26,7	25,8	
MCV	fL	87	86	87	86,00	86	87	87	86	87	
MCH	pg	30,5	30,4	30,3	30,70	30,8	30,5	30,3	30,2	29,7	
MCHC	g/dL	35	35,3	34,8	35,70	35,8	35,1	34,9	35,2	34,1	
RDW	%	15,8	14,9	16,5	16,30	16,1	16,5	15,9	16,1	17,4	
Thrombozyten	*10 ³ /µl	149	142	122	126,00	123	133	105	123	110	
Lymphozyten	%	21,4	21,5	21,5	22,50	25,3	24,2	25,2	22,3	23,7	
MID	%	13,1	11,2	10,1	13,90	10,4	11,1	10,4	11,3	10,1	
Granulozyten	%	65,5	67,3	68,4	63,60	64,3	64,7	64,4	66,4	66,2	
Lymphozyten	*10 ³ /µl	2,2	2,3	1,9	3,10	3,9	4,1	4,1	4,2	4,7	
MID	*10 ³ /µl	1,4	1,2	0,9	1,90	1,6	1,9	1,7	2,1	2	
Granulozyten	*10 ³ /µl	6,9	7,3	6	8,60	10	10,9	10,4	12,5	13	
Total Counts:											
	CD45+ (1)	Σ	11411	16325	14837	30454	17685	17145	16378	21773	22964
	CD45+ (2)	Σ	11411	28966	47376	26226	20061	20754	22554	20879	19072
	CD34+ (1)	Σ	89	169	153	184	151	160	125	148	138
	CD34+ (2)	Σ	89	232	354	155	162	176	157	128	110
	CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,78	1,04	1,03	0,60	0,85	0,93	0,76	0,68	0,60
	CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,78	0,80	0,75	0,59	0,81	0,85	0,70	0,61	0,58
	CD34 abs(1)	Σ	81,89	111,80	118,59	81,57	132,34	156,78	116,77	127,79	118,39
	CD34 abs(2)	Σ	81,89	86,50	85,93	79,79	125,17	142,47	106,50	115,25	113,62
	Mittelwert	Σ	81,89	99,15	102,26	80,68	128,76	149,62	111,64	121,52	116,00

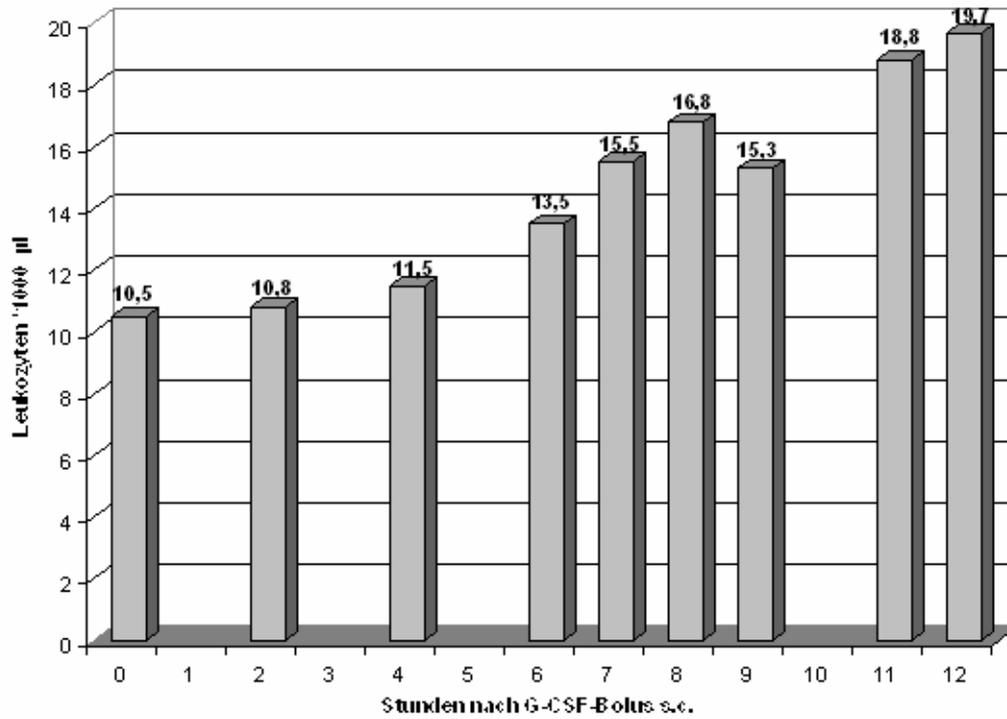
Leukozytenkonzentration

Minimum:	10,5 * 10 ³ /µl	(nach 0 h)	Maximum:	19,7 * 10 ³ /µl	(nach 12 h)
Δ Max/Min abs:	9,2 * 10 ³ /µl		Δ Max/Min rel.:	87 %	
Δ Vor/Nach abs:	9,2 * 10 ³ /µl		Δ Vor/Nach rel.:	87 %	

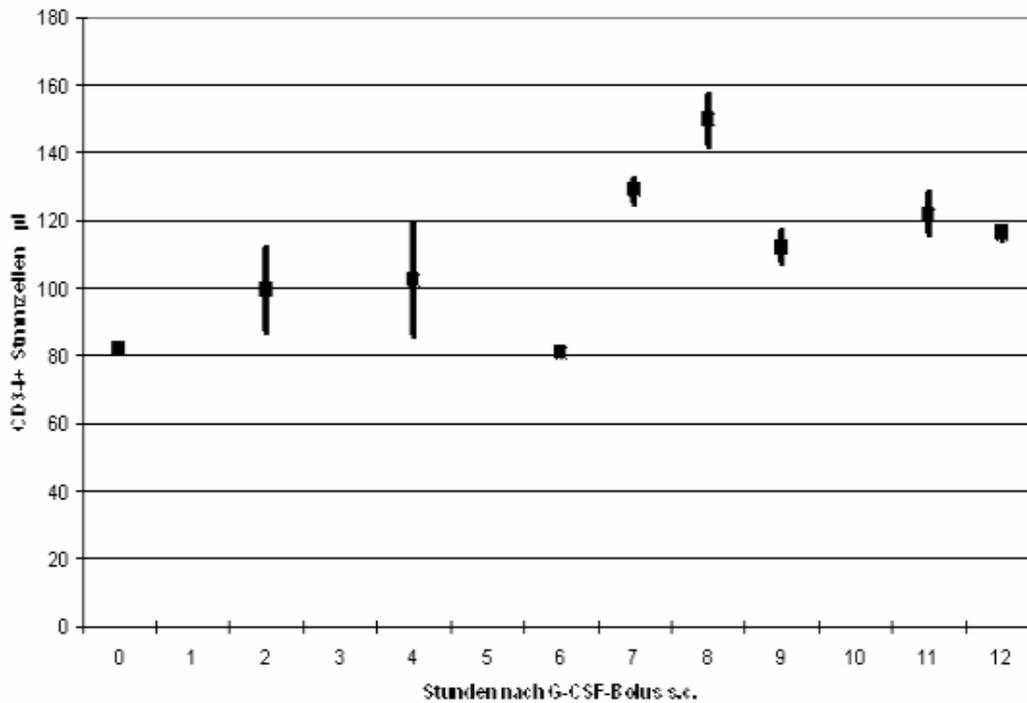
CD34+ Zellkonzentration

Minimum:	81 /µl	(nach 6 h)	Maximum:	150/ µl	(nach 8 h)
Δ Max/Min abs:	69 /µl		Δ Max/Min rel.:	85 %	
Δ Vor/Nach abs:	34 /µl		Δ Vor/Nach rel.:	41 %	

Monitoring der Leukozytenkonzentration
bei Patient 6 im zeitlichen Verlauf über 12 Stunden



Konzentration der CD34+ Stammzellen im venösen Blut
von Patient 6 unter dem Einfluß von G-CSF



Patient 7

Geburtsdatum: 03.04.1996
 Untersuchungstag: 17.01.2000
 Alter bei Untersuchung: 3 8/12 Jahre

Geschlecht: weiblich
 Gewicht: 15,6 kg
 Größe: 102 cm
 KOF: 0,66 m²

Beginn der Untersuchung: 15:00 Uhr
 Ende der Untersuchung: 03:00 Uhr

Diagnose: Neuroblastom
 Erstaufnahme: 02.11.1999
 Behandlung nach: NB97

Stimulationstage vor Monitoring: 14 Tage
 Vorherige Leukapheresen: 0
 Modus der Gabe: sub cutan

G-CSF/d: 75 µg

Ergebnisse

Leukozyten	*10 ³ /µl	15,9	15,4	16,8	17,1	18,2	17,8	18,2	18,4	19,6
Erythrozyten	*10 ⁶ /µl	2,92	2,71	2,76	2,72	2,65	2,58	2,63	2,51	2,58
Hb	g/dL	7,70	7,40	7,40	7,30	7,10	6,90	7,00	6,70	6,9
Hämatokrit	%	22,60	20,70	20,90	20,60	20,10	19,50	20,00	19,00	19,8
MCV	fL	77,30	76,40	75,90	75,70	76,00	75,40	76,00	75,70	76,6
MCH	pg	22,60	27,30	26,80	26,80	26,80	26,70	26,60	26,70	26,7
MCHC	g/dL	34,10	35,70	35,40	35,40	35,30	35,40	35,00	35,30	34,8
RDW	%	19,40	19,90	19,60	19,50	18,70	20,40	19,70	21,10	20,4
Thrombozyten	*10 ³ /µl	77,00	69,00	66,00	69,00	70,00	60,00	70,00	57,00	60
Lymphozyten	%	33,20	31,50	27,90	29,10	28,30	27,20	25,20	26,20	24,9
MID	%	9,20	9,00	9,60	8,30	9,40	9,40	11,00	7,80	8,3
Granulozyten	%	57,60	59,50	62,50	62,60	62,30	63,40	63,80	66,00	66,8
Lymphozyten	*10 ³ /µl	5,30	4,80	4,70	5,00	5,20	4,80	4,60	4,80	4,9
MID	*10 ³ /µl	1,50	1,40	1,60	1,40	1,70	1,70	2,00	1,40	1,6
Granulozyten	*10 ³ /µl	9,20	9,00	10,50	10,70	11,30	11,30	11,60	12,10	13,1
Total Counts:										
CD45+ (1)	Σ	26190		21871		20515	21997	20793	20343	20732
CD45+ (2)	Σ	23544	20990	20643	21944	28103	22078	29143	21587	26834
CD45+ (3)	Σ	21781					23107	22754	21124	24474
CD34+ (1)	Σ	148,00		97,00		69,00	79,00	109,00	83,00	77
CD34+ (2)	Σ	130,00	112,00	92,00	90,00	38,00	94,00	155,00	89,00	91
CD34+ (3)	Σ	134,00					102,00	110,00	93,00	71
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,57		0,44		0,34	0,36	0,52	0,41	0,37
CD34+ Anteil an CD45+ (2)	%	0,55	0,53	0,45	0,41	0,14	0,43	0,53	0,41	0,34
CD34+ Anteil an CD45+ (3)	%	0,62					0,44	0,48	0,44	0,29
CD34 abs(1)	Σ	89,85		74,51		61	63,93	95,41	75,07	72,80
CD34 abs(2)	Σ	87,79	82,17	74,87	70,13	24,61	75,79	96,80	75,86	66,47
CD34 abs(3)	Σ	97,82					78,57	87,98	81,01	56,86
Mittelwert		91,82	82,16	74,69	70,13	42,91	72,76	93,4	76,47	65,37

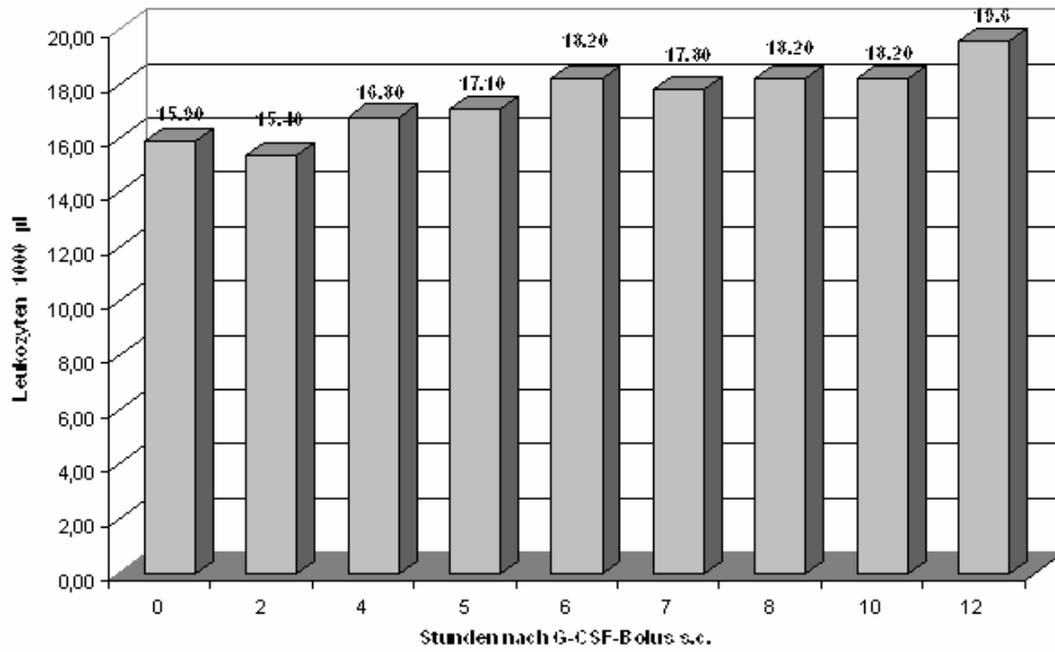
Leukozytenkonzentration

Minimum:	15,4 * 10 ³ /µl	(nach 2 h)	Maximum:	19,6 * 10 ³ /µl	(nach 12 h)
Δ Max/Min abs:	4,2 * 10 ³ /µl		Δ Max/Min rel.:	27 %	
Δ Vor/Nach abs:	3,7 * 10 ³ /µl		Δ Vor/Nach rel.:	23 %	

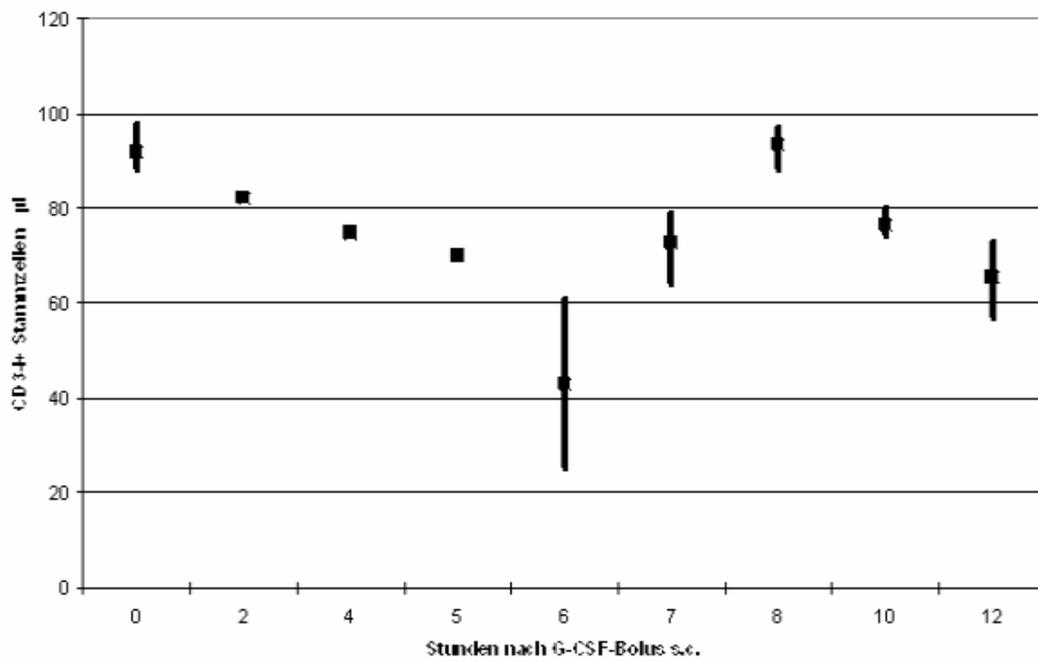
CD34+ Zellkonzentration

Minimum:	43 /µl	(nach 6 h)	Maximum:	93 /µl	(nach 8 h)
Δ Max/Min abs:	50 /µl		Δ Max/Min rel.:	116 %	
Δ Vor/Nach abs:	-26 /µl		Δ Vor/Nach rel.:	- 28 %	

Monitoring der Leukozytenkonzentration im venösen Blut
 von Patient 7 im zeitlichen Verlauf über 12 Stunden



Konzentration der CD34+ Stammzellen im venösen Blut
 von Patient 7 unter dem Einfluß von G-CSF



Patient 8

Geburtsdatum: 11.12.1981
 Untersuchungstag: 15.05.1998
 Alter bei Untersuchung: 16 6/12 Jahre

Geschlecht: männlich
 Gewicht: 61 kg
 Größe: 179 cm
 KOF: 1,74 m²

Beginn der Untersuchung: 18:00 Uhr
 Ende der Untersuchung: 06:00 Uhr

Diagnose: Rhabdomyosarkom
 Erstaufnahme: 23.11.1998
 Behandlung nach: CWS 96
 G-CSF/d: 480 µg

Stimulationstage vor Monitoring: 10
 Vorherige Leukapheresen: 0
 Modus der Gabe: sub cutan

Ergebnisse Blutbild

Leukozyten	*10 ³ /µl	9,40	7,70	15,00	16,00	18,50	17,70	18,20	17,00	15,80
Erythrozyten	*10 ⁶ /µl	2,77	2,65	2,73	2,64	2,61	2,69	2,78	2,79	2,85
Hb	g/dL	8,60	8,40	8,70	8,50	8,90	8,50	8,80	8,90	9,00
Hämatokrit	%	24,10	23,10	23,80	23,20	23,00	23,70	24,20	24,60	25,10
MCV	fL	87,00	87,00	87,00	88,00	88,00	88,00	87,00	88,00	88,00
MCH	pg	31,00	31,70	31,60	32,20	34,10	31,60	31,70	31,90	31,60
MCHC	g/dL	35,70	36,40	36,60	36,60	38,70	35,90	36,40	36,20	35,90
RDW	%	16,80	16,10	16,90	15,90	16,30	15,90	16,10	16,90	15,80
Thrombozyten	*10 ³ /µl	20,00	36,00	40,00	39,00	40,00	35,00	34,00	31,00	32,00
Lymhozyten	%		9,30	6,50	6,20	6,30	6,40	6,70	5,80	7,50
MID	%		8,00	7,90	7,20	7,60	5,80	5,50	5,00	5,40
Granulozyten	%		82,00	85,60	86,60	86,10	87,80	87,80	89,20	87,10
Lymphozyten	*10 ³ /µl		0,70	1,00	1,00	1,20	1,10	1,20	1,00	1,20
MID	*10 ³ /µl		0,60	1,20	1,20	1,40	1,00	1,00	0,90	0,90
Granulozyten	*10 ³ /µl		6,40	12,80	13,90	15,90	15,50	16,00	15,20	13,80
Total Counts:										
CD45+ (1)	∑	16893	25527	30951	27959	107073	86685	8578	9032	6934
CD45+ (2)	∑	4722	232040	4936	28655	23476	6891		7954	24638
CD45+ (3)	∑	15922	7355							
CD34+ (1)	∑	100	160	112	128	330	325	45	57	55
CD34+ (2)	∑	45	925	25	106	75	51		82	154
CD34+ (3)	∑	84	40							
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,59	0,63	0,36	0,46	0,31	0,37	0,52	0,63	0,79
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,95	0,40	0,51	0,37	0,32	0,74		1,03	0,63
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,53	0,54							
CD34 abs(1)	∑	56	48	54	73	57	66	95	107	125
CD34 abs(2)	∑	90	31	76	59	59	131		175	99
CD34 abs(3)	∑	50	42							
Mittelwert		65	40	65	66	58	99	95	141	112

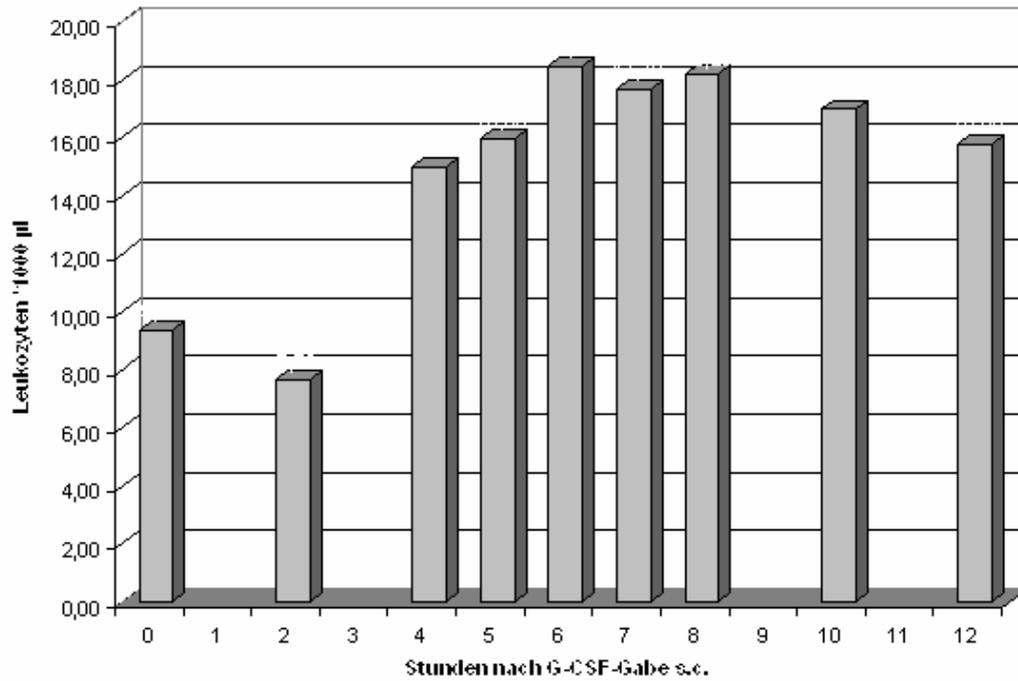
Leukozytenkonzentration

Minimum:	9,4 * 10 ³ /µl	(nach 0 h)	Maximum:	18,2 * 10 ³ /µl	(nach 6 h und 8 h)
Δ Max/Min abs:	8,8 * 10 ³ /µl		Δ Max/Min rel.:	94 %	
Δ Vor/Nach abs:	6,4 * 10 ³ /µl		Δ Vor/Nach rel.:	68 %	

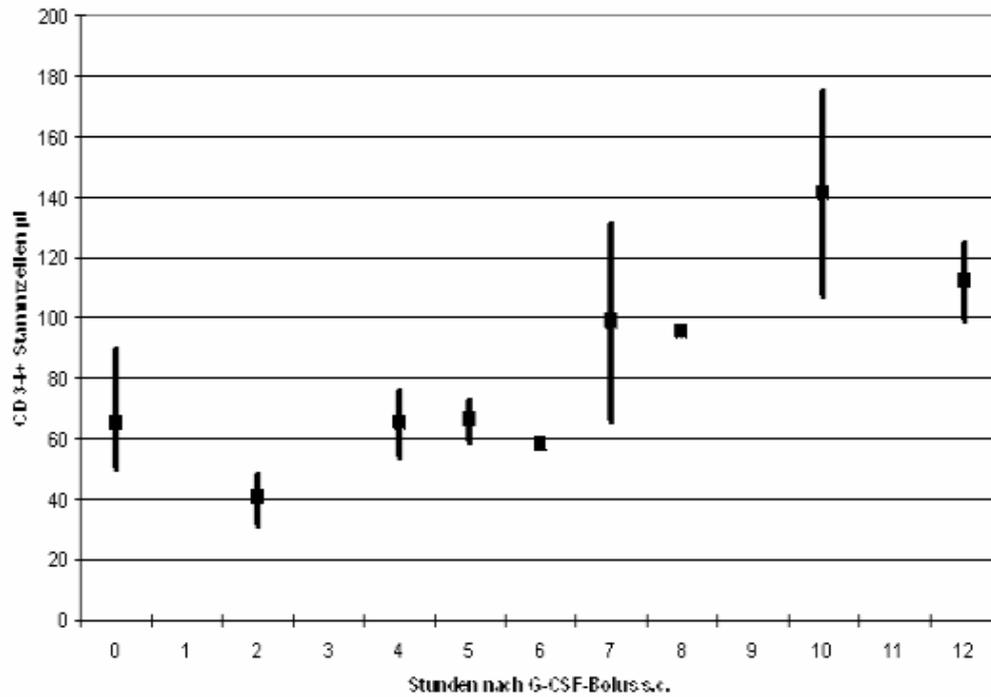
CD34+ Zellkonzentration

Minimum:	40 /µl	(nach 2 h)	Maximum:	141 /µl	(nach 10 h)
Δ Max/Min abs:	101 /µl		Δ Max/Min rel.:	253 %	
Δ Vor/Nach abs:	47 /µl		Δ Vor/Nach rel.:	72 %	

Monitoring der Leukozytenkonzentration
bei Patient 8 im zeitlichen Verlauf über 12 Stunden



Monitoring der Leukozytenkonzentration im venösen Blut
bei Patient 8 unter dem Einfluß von G-CSF



Patient 9

Geburtsdatum: 20.12.1995
 Untersuchungstag: 21.01.2000
 Alter bei Untersuchung: 14 1/12 Jahre

Geschlecht: männlich
 Gewicht: 70 kg
 Größe: 173 cm
 KOF: 1,83 m²

Beginn der Untersuchung: 14:00 Uhr
 Ende der Untersuchung: 02:00 Uhr

Diagnose: Ewingsarkom
 Erstaufnahme: 02.11.1999
 Behandlung nach: E.W.I.N.G.99

Stimulationstage vor Monitoring: 9
 Vorherige Leukapheresen: 0
 Modus der Gabe: sub cutan

G-CSF/d: 480 µg

Ergebnisse

Leukozyten	*10 ³ /µl	10,5	11,0	13,1	14,2	14,5	17,0	18,4	22,9	22,7
Erythrozyten	*10 ⁶ /µl	3,14	2,98	2,95	2,84	2,80	2,98	2,88	2,91	2,91
Hb	g/dL	8,80	8,20	8,10	8	7,70	8,20	7,90	8,20	8,1
Hämatokrit	%	25,10	23,90	23,60	23	22,40	23,80	23,10	23,30	23,3
MCV	fL	80,00	80,30	80,00	81	80,10	79,80	80,20	80,20	79,9
MCH	pg	28,00	27,50	27,50	28,2	27,50	27,50	27,40	28,20	27,8
MCHC	g/dL	35,10	34,30	34,30	34,8	34,40	34,50	34,20	35,20	34,8
RDW	%	21,60	20,90	22,80	20,9	21,90	20,80	20,10	22,00	21
Thrombozyten	*10 ³ /µl	28,00	26,00	27,00	28	27,00	28,00	28,00	33,00	33
Lymphozyten	%	15,80	14,00	12,10	12,3	13,10	11,80	11,70	10,20	9,7
MID	%	7,80	7,30	9,70	7	6,40	6,20	7,10	6,70	5,8
Granulozyten	%	76,40	78,70	78,20	80,7	80,50	82,00	81,20	83,10	84,5
Lymphozyten	*10 ³ /µl	1,70	1,50	1,60	1,7	1,90	2,00	2,20	2,30	2,2
MID	*10 ³ /µl	0,80	0,80	1,30	1	0,90	1,10	1,30	1,50	1,3
Granulozyten	*10 ³ /µl	8,00	8,70	10,20	11,5	11,70	13,90	14,90	19,00	19,2
Total Counts:										
CD45+ (1)	Σ	94310	34222	42069	30028	67043	22811	24191	22610	22615
CD45+ (2)	Σ	22318	31337	23479	26010	35163	21127	20228	26008	22360
CD45+ (3)	Σ	22098	37834	26900	33811	33855	20921	20242	23286	20671
CD34+ (1)	Σ	591	241	224	153	280	93	96	104	91
CD34+ (2)	Σ	147	251	99	119	147	77	77	112	105
CD34+ (3)	Σ	140,	250	142	196	129	85	68	86	116
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,63	0,70	0,53	0,51	0,42	0,41	0,40	0,46	0,40
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,66	0,80	0,42	0,46	0,42	0,36	0,38	0,43	0,47
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,63	0,66	0,53	0,58	0,38	0,41	0,34	0,37	0,56
CD34 abs(1)	Σ	66	77	70	72	61	69	73	105	91
CD34 abs(2)	Σ	69	88	55	65	61	62	70	99	107
CD34 abs(3)	Σ	67	73	69	82	55	69	62	85	127
Mittelwert		67	79	65	73	59	67	68	96	108

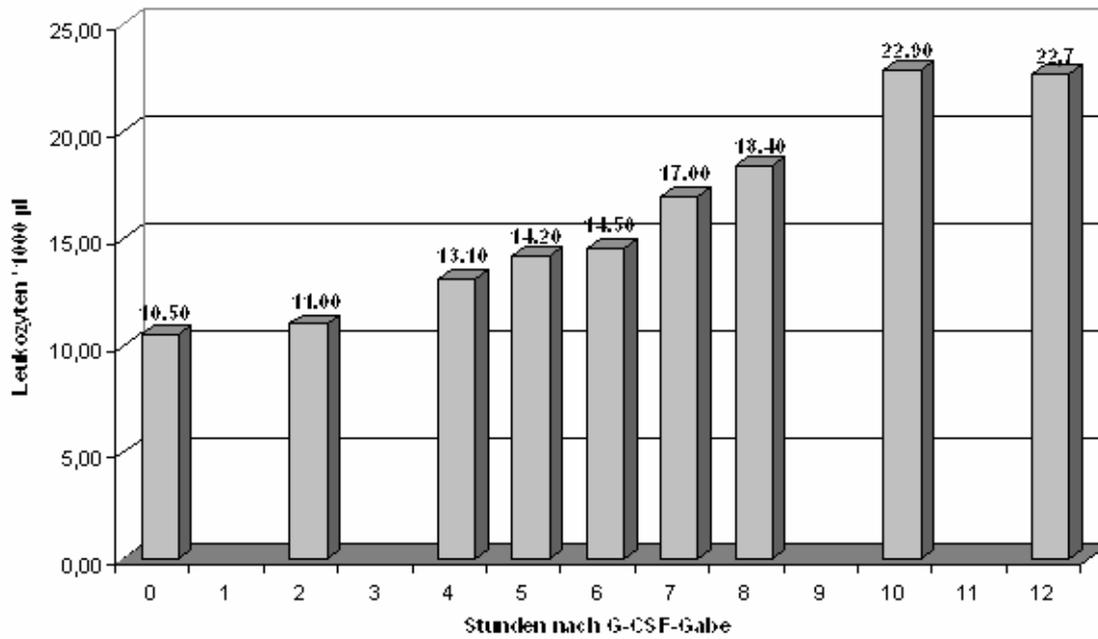
Leukozytenkonzentration

Minimum:	3,6 * 10 ³ /µl	(nach 0 h)	Maximum:	5,5 * 10 ³ /µl	(nach 12 h)
Δ Max/Min abs:	1,9 * 10 ³ /µl		Δ Max/Min rel.:	53 %	
Δ Vor/Nach abs:	1,9 * 10 ³ /µl		Δ Vor/Nach rel.:	53 %	

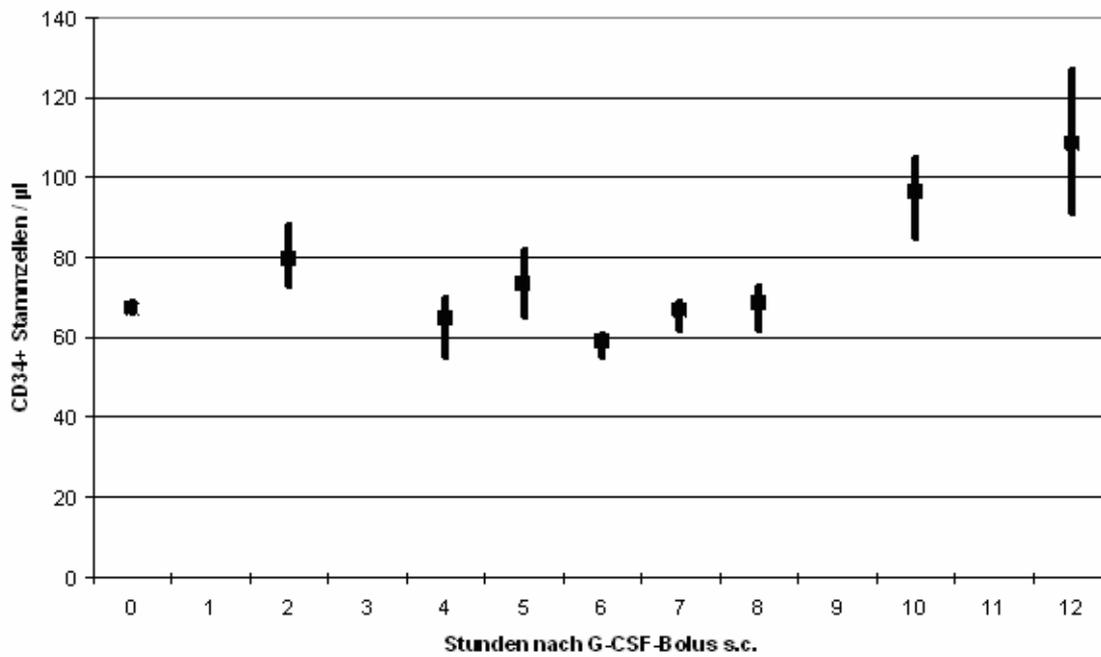
CD34+ Zellkonzentration

Minimum:	8 / µl	(nach 0 h)	Maximum:	22 / µl	(nach 10 h)
Δ Max/Min abs:	14 /µl		Δ Max/Min rel.:	175 %	
Δ Vor/Nach abs:	12 /µl		Δ Vor/Nach rel.:	150 %	

Monitoring der Leukozytenkonzentration
bei Patient 9 im zeitlichen Verlauf über 12 Stunden



Konzentration der CD34+ Stammzellen im peripher venösen Blut
von Patient 9 unter dem Einfluß von G-CSF



Patient 10

Geburtsdatum: 09.01.1991
 Untersuchungstag: 21.09.1998
 Alter bei Untersuchung: 7 8/12 Jahre

Geschlecht: männlich
 Gewicht: 22,4 kg
 Größe: 132
 KOF: 0,91 m²

Beginn der Untersuchung: 15.00 Uhr
 Ende der Untersuchung: 03:00 Uhr

Diagnose: NHL
 Erstdiagnose: 27.04.1998
 Behandlung: NHL-BFM 95

Stimulationstage vor Monitoring: 9
 Vorherige Leukapheresen: 0
 Modus der Gabe: sub cutan

G-CSF/d: 150 µg

Ergebnisse

Leukozyten	*10 ³ /µl	25	25,8	38,6	39,6	38,5	45,2	46,4	31
Erythrozyten	*10 ⁶ /µl	4,75	3,97	3,82	3,88	3,75	3,76	3,78	3,62
Hb	g/dL	13,4	11,1	10,6	10,7	10,6	10,5	10,6	10,3
Hämatokrit	%	39,4	33	31,7	31,8	30,8	31,2	31,8	30
MCV	fL	83	83	83	82	82	83	84	83
MCH	pg	28,2	28	27,7	27,6	28,3	27,9	28	28,5
MCHC	g/dL	34	33,6	33,4	33,6	34,4	33,7	33,3	34,3
RDW	%	16	17	15,9	16,2	17,6	17,3	16,7	16,2
Thrombozyten	*10 ³ /µl	90	112	119	125	117	119	117	116
Lymphozyten	%	13,6	13,6	14,5	14,3	16,7	12,6	15,1	16,0
MID	%	6,2	6,4	8,3	5,6	12,2	8,0	7,3	10,1
Granulozyten	%	80,2	80	77	80,1	71,1	79,4	77,6	73,9
Lymphozyten	*10 ³ /µl	3,4	3,5	5,6	5,7	6,4	5,7	7,0	5,0
MID	*10 ³ /µl	1,6	1,7	3,2	2,2	4,7	3,6	3,4	3,1
Granulozyten	*10 ³ /µl	20,1	20,6	29,8	31,7	27,4	35,9	36	22,9
Total Counts:									
CD45+ (1)	Σ	15428	28324	14669	16114	24665	11603	20761	9400
CD45+ (2)	Σ	13447	33540	13794	12955	13275	17649	12739	18829
CD34+ (1)	Σ	106	250	87	75	150	75	88	87
CD34+ (2)	Σ	126	235	75	75	75	109	71	120
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,69	0,70	0,54	0,47	0,56	0,62	0,42	0,93
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,94	0,88	0,59	0,58	0,61	0,65	0,56	0,64
CD34 abs(1)	Σ	172	181	199	184	218	279	297	287
CD34 abs(2)	Σ	234	227	217	229	234	292	259	198
Mittelwert	Σ	203	204	208	207	226	286	228	242

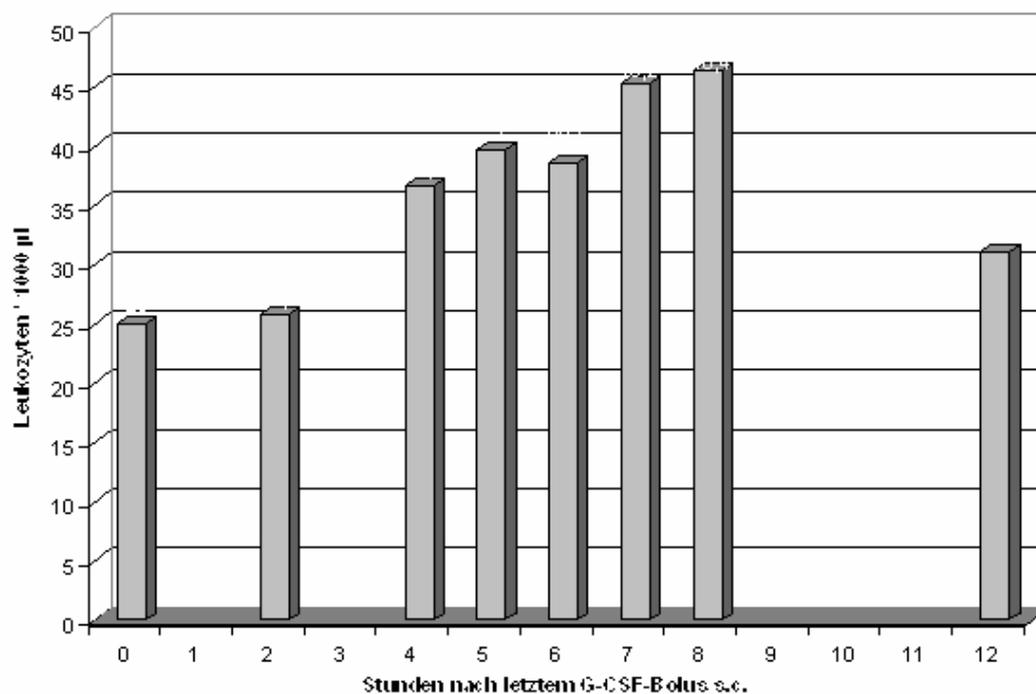
Leukozytenkonzentration

Minimum:	25,0 * 10 ³ /µl	(nach 0 h)	Maximum:	46,4 * 10 ³ /µl	(nach 8 h)
Δ Max/Min abs:	21,4 * 10 ³ /µl		Δ Max/Min rel.:	86 %	
Δ Vor/Nach abs:	6 * 10 ³ /µl		Δ Vor/Nach rel.:	24 %	

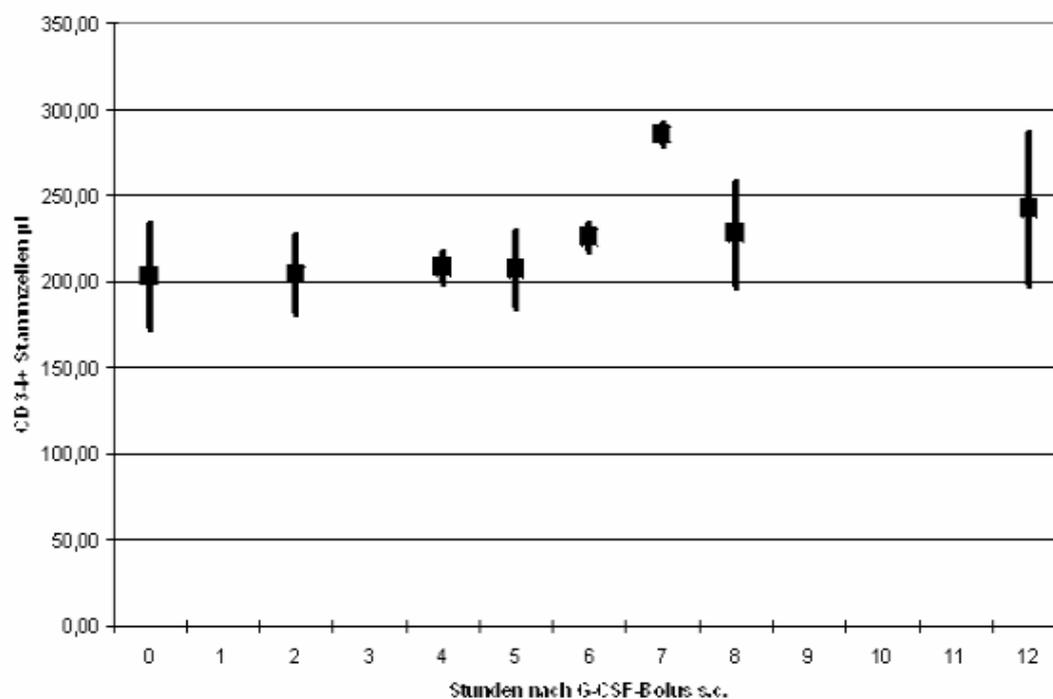
CD34+ Zellkonzentration

Minimum:	203 / µl	(nach 0 h)	Maximum:	286 / µl	(nach 7 h)
Δ Max/Min abs:	83 /µl		Δ Max/Min rel.:	41 %	
Δ Vor/Nach abs:	39 /µl		Δ Vor/Nach rel.:	19 %	

Monitoring der Leukozytenkonzentration
 bei Patient 10 im zeitlichen Verlauf über 12 Stunden



Konzentration der CD 34+ Stammzellen im peripher venösen Blut
 von Patient 10 unter dem Einfluß von G-CSF



Patient 11

Geburtsdatum:	06.09.1982	Geschlecht:	männlich
Untersuchungstag:	02.09.1999	Gewicht:	60 kg
Alter bei Untersuchung:	17 Jahre	Größe:	163 cm
		KOF:	1,64 m ²
Beginn der Untersuchung:	18:00 Uhr	Diagnose:	Osteosarkom-Rezidiv
Ende der Untersuchung:	06:00 Uhr	Erstaufnahme:	07.11.1997
		Behandlung nach:	COSS96
Stimulationstage vor Monitoring:	9 Tage	G-CSF/d:	480 µg
Vorherige Leukapheresen:	0		
Modus der Gabe:	sub cutan		

Bemerkungen und Besonderheiten zum Verlauf des Monitoring:
 Patient ist zu Beginn des Monitoring aufgrund der Narkose zur ZVK-Implantation noch stark benommen. Arbeitet später gut mit. Nachtruhe gegen 2 Uhr morgens.
 Medikation: 1x Paracetamol 500 gegen Kopfschmerzen in Folge der Narkose

Ergebnisse

Leukozyten	*10 ³ /µl	8,00	8,50	8,60	8,60	8,90	9,50	9,90	10,40	10,30
Erythrozyten	*10 ⁶ /µl	2,61	2,45	2,41	2,47	2,63	2,61	2,54	2,53	2,48
Hb	g/dL	7,70	7,40	7,20	7,40	7,70	7,60	7,50	7,40	7,30
Hämatokrit	%	22,20	20,90	20,50	21,00	22,30	22,00	21,70	21,40	20,90
MCV	fL	85,00	85,20	85,00	85,00	84,70	84,20	85,30	84,70	84,20
MCH	pg	29,50	30,20	29,90	30,00	29,30	29,10	29,50	29,20	29,40
MCHC	g/dL	34,70	35,40	35,10	35,20	34,50	34,50	34,60	34,60	34,90
RDW	%	13,80	15,30	13,00	13,70	14,30	13,90	15,50	13,00	13,60
Thrombozyten	*10 ³ /µl	49,00	46,00	40,00	46,00	45,00	46,00	43,00	42,00	40,00
Lymphozyten	%	24,10	21,80	22,00	21,60	20,70	19,70	21,20	18,60	18,60
MID	%	7,00	6,40	8,00	6,50	5,90	6,10	9,20	7,90	6,70
Granulozyten	%	68,90	71,80	70,00	71,90	73,40	74,20	69,60	73,50	74,70
Lymphozyten	*10 ³ /µl	1,90	1,90	1,90	1,90	1,80	1,90	2,10	1,90	1,90
MID	*10 ³ /µl	0,60	0,50	0,70	0,60	0,50	0,60	0,90	0,80	0,70
Granulozyten	*10 ³ /µl	5,50	6,10	6,00	6,20	6,50	7,00	6,90	7,60	7,70
Total Counts:										
CD45+ (1)	Σ	24949	30292	29267	31804	30174	46913	31902		42768
CD45+ (2)	Σ	27031	25208	25082	33088	41776	69099	32418		44243
CD45+ (3)	Σ	3593	26137	26324	33379	79133	29883			
CD34+ (1)	Σ	72	84	64	99	71	123	68		91
CD34+ (2)	Σ	86	63	81	90	90	174	54		87
CD34+ (3)	Σ	7	60	79	91	133	47			
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,29	0,28	0,22	0,31	0,24	0,26	0,21		0,21
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,32	0,25	0,32	0,27	0,22	0,25	0,17		0,20
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,19	0,23	0,30	0,27	0,17	0,16			
CD34 abs(1)	Σ	23	24	19	27	21	25	21		22
CD34 abs(2)	Σ	25	21	28	23	19	24	16		20
CD34 abs(3)	Σ	16	20	26	23	15	15			
Mittelwert		21,38	21,44	24,13	24,54	18,36	21,26	18,80		21,08

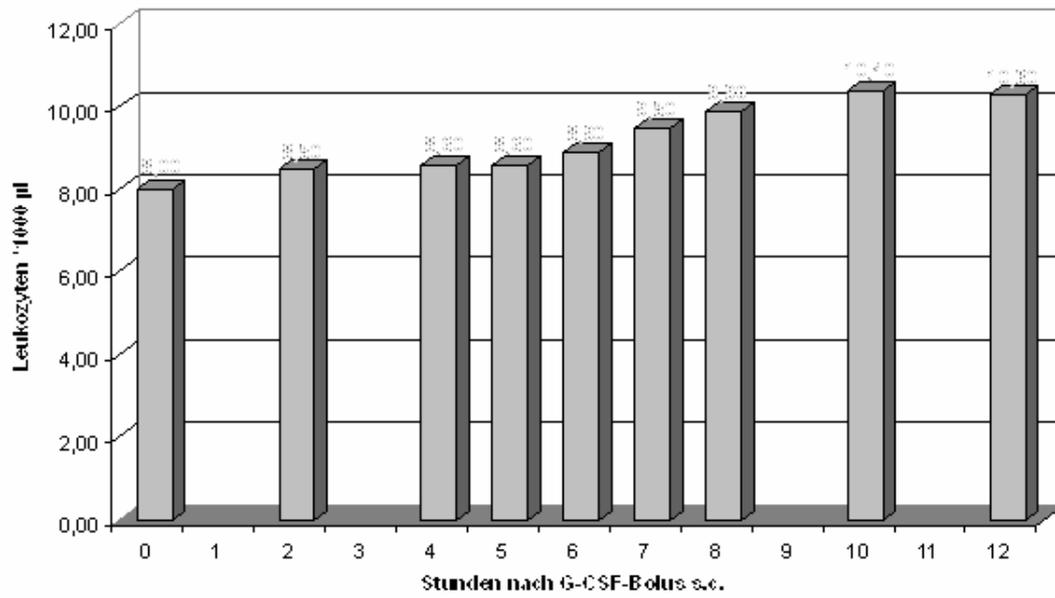
Leukozytenkonzentration

Minimum:	8,0 * 10 ³ /µl	(nach 0 h)	Maximum:	10,3 * 10 ³ /µl	(nach 12 h)
Δ Max/Min abs:	2,3 * 10 ³ /µl		Δ Max/Min rel.:	35 %	
Δ Vor/Nach abs:	2,3 * 10 ³ /µl		Δ Vor/Nach rel.:	35 %	

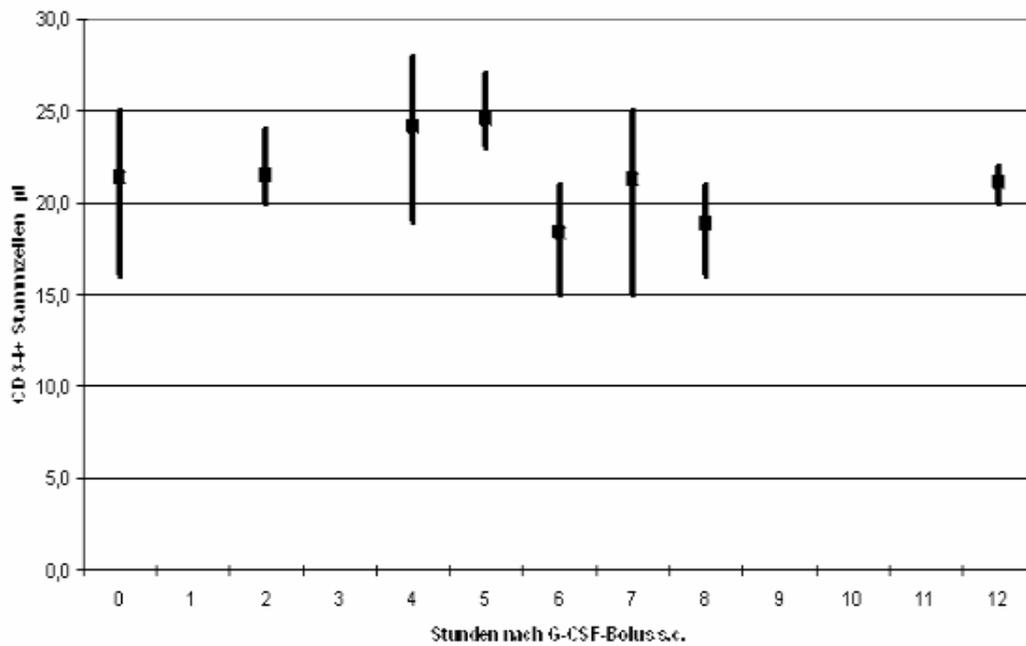
CD34+ Zellkonzentration

Minimum:	18,6 / µl	(nach 6 h)	Maximum:	24,54 / µl	(nach 5 h)
Δ Max/Min abs:	5,94 /µl		Δ Max/Min rel.:	32 %	
Δ Vor/Nach abs:	-0,3 /µl		Δ Vor/Nach rel.:	1,6 %	

Monitoring der Leukozytenkonzentration
bei Patient 11 im zeitlichen Verlauf über 12 Stunden



Konzentration der CD34+ Stammzellen im venösen Blut
bei Patient 11 unter dem Einfluß von G-CSF



Patient 12

Geburtsdatum: 26.12.1996
 Untersuchungstag: 23.05.2000
 Alter bei Untersuchung: 2 5/12 Jahre

Geschlecht: männlich
 Gewicht: 16,7 kg
 Größe: 100 cm
 KOF: 0,68 m²

Beginn der Untersuchung: 16:15 Uhr
 Ende der Untersuchung: 04:15 Uhr

Diagnose: Neuroblastom
 Erstaufnahme: 10.01.2000
 Behandlung nach: NB97

Stimulationstage vor Monitoring: Tage
 Vorherige Leukapheresen: 0
 Modus der Gabe: sub cutan

G-CSF/d: 100 µg

Ergebnisse

Leukozyten	*10 ³ /µl	8,60	11,30	12,30	13,80	14,80	14,00	17,20	15,60	18,30
Erythrozyten	*10 ⁶ /µl	2,62	2,56	2,51	2,58	2,58	2,48	2,59	2,51	2,57
Hb	g/dL	7,40	7,20	7,10	7,20	7,30	6,90	7,10	7,00	7,20
Hämatokrit	%	21,50	20,70	20,50	21,10	20,80	20,10	21,00	20,60	20,90
MCV	fL	82,00	80,90	81,60	81,60	80,70	81,00	81,10	82,00	81,40
MCH	pg	28,20	28,10	28,30	27,90	28,30	27,80	27,40	27,90	28,00
MCHC	g/dL	34,40	34,80	34,60	34,10	35,10	34,30	33,80	34,00	34,40
RDW	%	14,70	15,90	15,80	15,50	16,60	15,80	15,00	16,50	15,40
Thrombozyten	*10 ³ /µl	13,00	13,00	13,00	15,00	17,00	15,00	21,00	14,00	16,00
Lymphozyten	%	16,20	15,10	12,90	13,30	12,00	17,30	17,10	17,20	15,20
MID	%	14,70	14,40	13,40	12,70	11,40	10,10	12,40	11,90	13,10
Granulozyten	%	69,10	70,50	73,70	74,00	76,60	72,60	70,50	70,90	71,70
Lymphozyten	*10 ³ /µl	1,40	1,70	1,60	1,80	1,80	2,40	2,90	2,70	2,80
MID	*10 ³ /µl	1,30	1,60	1,60	1,80	1,70	1,40	2,10	1,90	2,40
Granulozyten	*10 ³ /µl	5,90	8,00	9,10	10,20	11,30	10,20	12,10	11,10	13,10
Total Counts:										
CD45+ (1)	Σ	42809	26592	21755	29074	22927	21177	27705	20385	19679
CD45+ (2)	Σ	20092	21923	23612	23164	30872	24018	20725	21921	20111
CD45+ (3)	Σ	25094	15454	20001	28890	25316	26511	20687	21022	21093
CD34+ (1)	Σ	243	120	120	116	91	73	121	72	96
CD34+ (2)	Σ	93	86	108	113	129	60	94	115	99
CD34+ (3)	Σ	110	74	97	142	110	111	96	79	117
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,57	0,45	0,55	0,40	0,40	0,34	0,44	0,35	0,49
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,46	0,39	0,46	0,49	0,42	0,25	0,45	0,52	0,49
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,44	0,48	0,48	0,49	0,43	0,42	0,46	0,38	0,55
CD34 abs(1)	Σ	49	51	68	55	59	48	75	55	89
CD34 abs(2)	Σ	40	44	56	67	62	35	78	82	90
CD34 abs(3)	Σ	38	54	60	68	64	59	80	59	102
Mittelwert		42,11	49,81	61,25	63,40	61,63	47,28	77,65	65,19	93,62

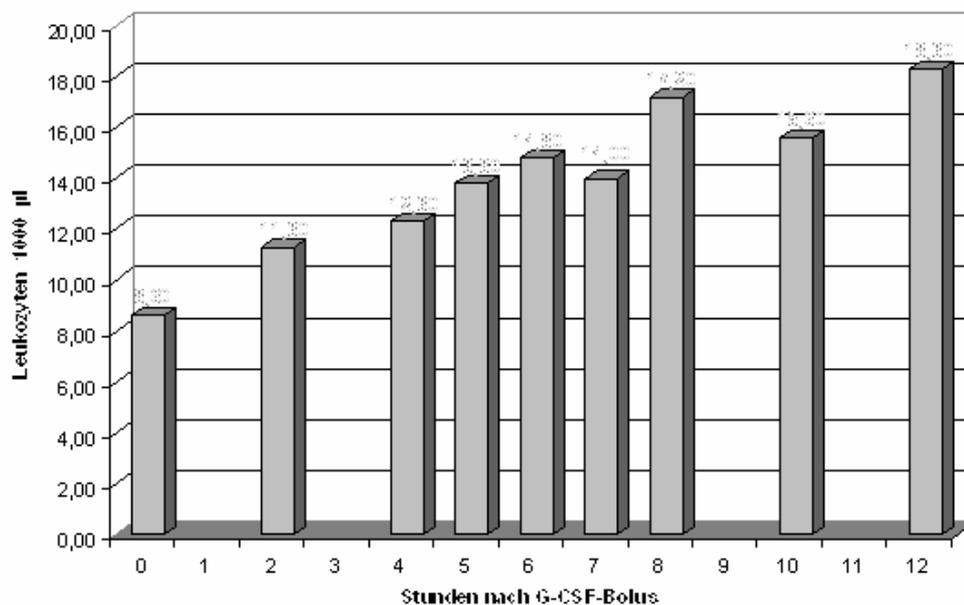
Leukozytenkonzentration

Minimum:	8,6 * 10 ³ /µl	(nach 0 h)	Maximum:	18,3 * 10 ³ /µl	(nach 12 h)
Δ Max/Min abs:	9,7 * 10 ³ /µl		Δ Max/Min rel.:	113 %	
Δ Vor/Nach abs:	9,7 * 10 ³ /µl		Δ Vor/Nach rel.:	113 %	

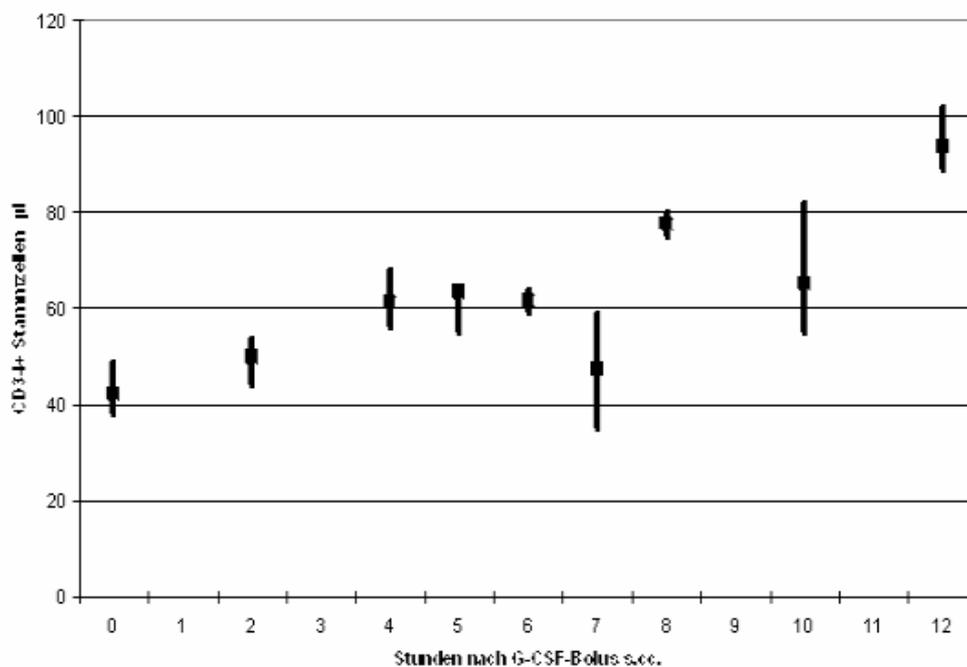
CD34+ Zellkonzentration

Minimum:	42 / µl	(nach 6 h)	Maximum:	94 / µl	(nach 8 h)
Δ Max/Min abs:	52 / µl		Δ Max/Min rel.:	123 %	
Δ Vor/Nach abs:	52 / µl		Δ Vor/Nach rel.:	123 %	

Monitoring der Leukozytenkonzentration
bei Patient 12 im zeitlichen Verlauf über 12 Stunden



Konzentration der CD34+ Stammzellen im venösen Blut
bei Patient 12 unter dem Einfluß von G-CSF



Patient 13

Geburtsdatum: 12.10.1996
 Untersuchungstag: 05.02.2001
 Alter bei Untersuchung: 4,25 Jahre

Geschlecht: männlich
 Gewicht: 18,5 kg
 Größe: 108 cm
 KOF: 0,74 m²

Beginn der Untersuchung: 15:30 Uhr
 Ende der Untersuchung: 03:30 Uhr

Diagnose: Neuroblastom IV
 Erstaufnahme: 20.08.1998
 Behandlung nach: NB97

Stimulationstage vor Monitoring: Tage
 Vorherige Leukapheresen: 0
 Modus der Gabe: sub cutan

G-CSF/d: 100 µg

Ergebnisse Blutbild

Leukozyten	*10 ³ /µl	6,0	6,2	8,4	9,52	10,5	10,6	10,3	11,9	13,8
Erythrozyten	*10 ⁶ /µl	3,04	3,18	3,00	2,89	2,87	2,95	2,82	2,76	2,93
Hb	g/dL	8,35	8,95	8,51	8,06	8,09	8,10	7,94	7,81	8,26
Hämatokrit	%	24,40	25,70	24,30	23,30	23,10	23,80	22,80	22,20	23,60
MCV	fL	80,30	80,80	80,90	80,80	80,50	80,60	80,20	80,20	80,50
MCH	pg	27,50	28,10	28,40	27,90	28,20	27,50	28,20	28,30	28,20
MCHC	g/dL	34,40	34,80	35,10	34,50	35,00	34,10	34,80	35,20	35,00
RDW	%	19,50	20,00	20,60	19,70	20,60	20,60	19,30	18,10	21,10
Thrombozyten	*10 ³ /µl	25,30	17,30	15,40	21,10	18,70	22,60	16,30	19,90	12,60
Lymhozyten	%									
MID	%	51,70	58,80	57,40	58,40	60,00	60,30	61,60	54,10	66,00
Granulozyten	%	1,52	1,08	1,90	20,10	1,96	2,39	1,69	2,36	1,74
Lymphozyten	*10 ³ /µl									
MID	*10 ³ /µl	3,11	3,66	4,85	5,56	6,31	6,40	6,37	7,62	9,11
Granulozyten	*10 ³ /µl	25,30	17,30	15,40	21,10	18,70	22,60	16,30	19,90	12,60
Total Counts1		21126	20549	22055	26526	21897	20485	19754	20365	25689
Total Counts2		21024	20158	21045	23599	24229	32772	20418	20274	
Total Counts3		20825	20132	22273	21150	29413	32723	20181	19985	
CD34+ (1)		542	602	660	721	501	478	482	476	648
CD34+ (2)		542	569	569	611	531	822	482	458	
CD34+ (3)		503	562	554	578	633	790	521	497	
Anteil an Leukozyten (1)	%	2,57	2,93	2,99	2,72	2,29	2,33	2,44	2,34	2,52
Anteil an Leukozyten (2)	%	2,58	2,82	2,70	2,59	2,19	2,51	2,36	2,26	
Anteil an Leukozyten (3)	%	2,42	2,79	2,49	2,73	2,15	2,41	2,58	2,49	
CD34 abs(1)		154	182	251	259	240	247	251	278	348
CD34 abs(2)		155	175	227	246	230	266	243	269	
CD34 abs(3)		145	173	209	260	226	256	266	296	
Mittelwert		151,18		176,57		229,14	255,14	232,11	256,37	253,46

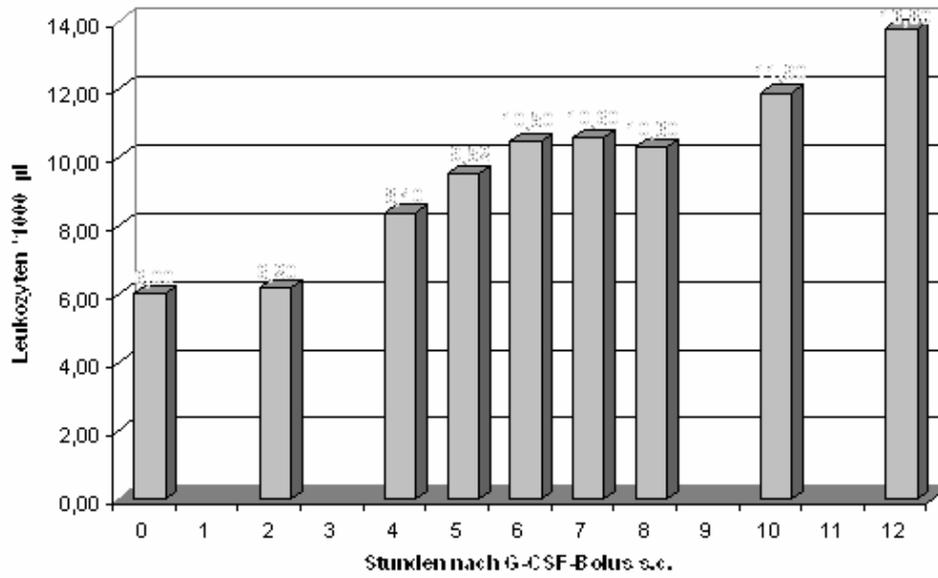
Leukozytenkonzentration

Minimum:	6,0 * 10 ³ /µl	(nach 0 h)	Maximum:	13,8*10 ³ /µl	(nach 12 h)
Δ Max/Min abs:	7,8 * 10 ³ /µl		Δ Max/Min rel.:	130 %	
Δ Vor/Nach abs:	7,8 * 10 ³ /µl		Δ Vor/Nach rel.:	130 %	

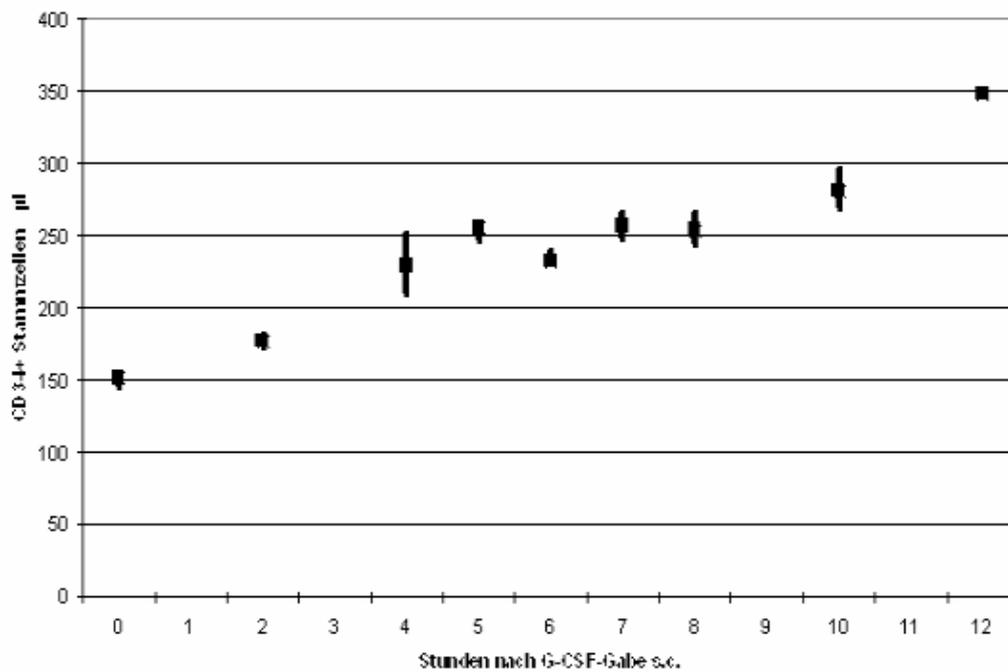
CD34+ Zellkonzentration

Minimum:	151 / µl	(nach 0 h)	Maximum:	256 / µl	(nach 10 h)
Δ Max/Min abs:	105 /µl		Δ Max/Min rel.:	70 %	
Δ Vor/Nach abs:	102 /µl		Δ Vor/Nach rel.:	68 %	

Monitoring der Leukozytenkonzentration
 bei Patient 13 im zeitlichen Verlauf über 12 Stunden



Konzentration der CD 34+ Stammzellen im venösen Blut
 bei Patient 13 unter dem Einfluß von G-CSF



Patient 14

Geburtsdatum: 03.11.1997
 Untersuchungstag: 18.03.2001
 Alter bei Untersuchung: 3 4/12 Jahre

Geschlecht: männlich
 Gewicht: 16,9 kg
 Größe: 101 cm
 KOF: 0,69 m²

Beginn der Untersuchung: 14 Uhr
 Ende der Untersuchung: 2 Uhr

Diagnose: Neuroblastom
 Erstaufnahme: 04.12.2000
 Behandlung nach: NB97

Stimulationstage vor Monitoring: 22
 Vorherige Leukapheresen: 0
 Modus der Gabe: sub cutan

G-CSF/d: 100 µg

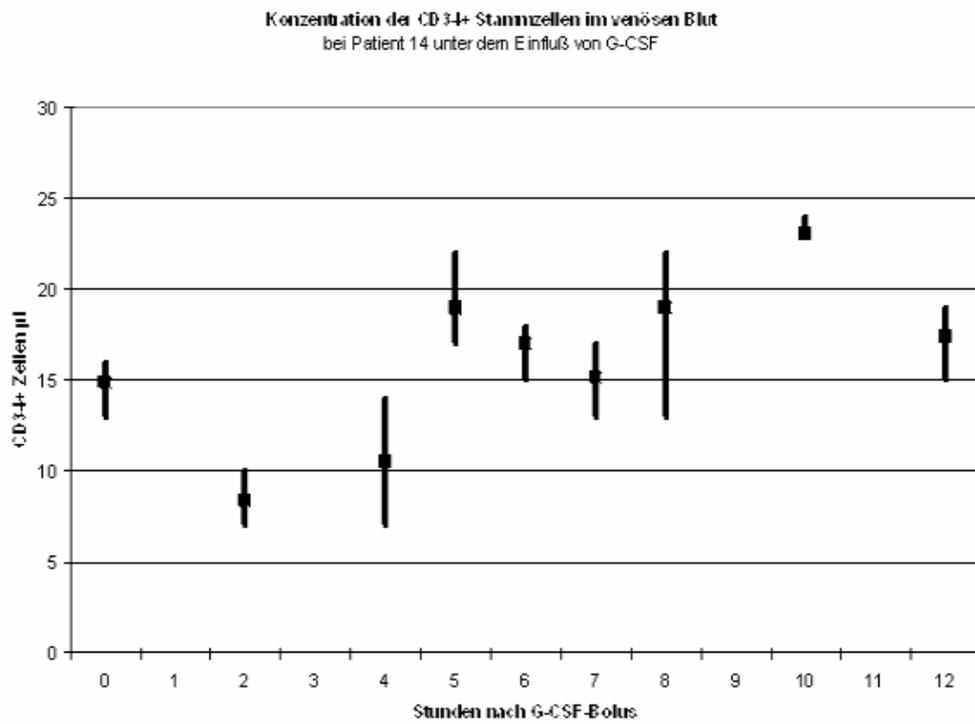
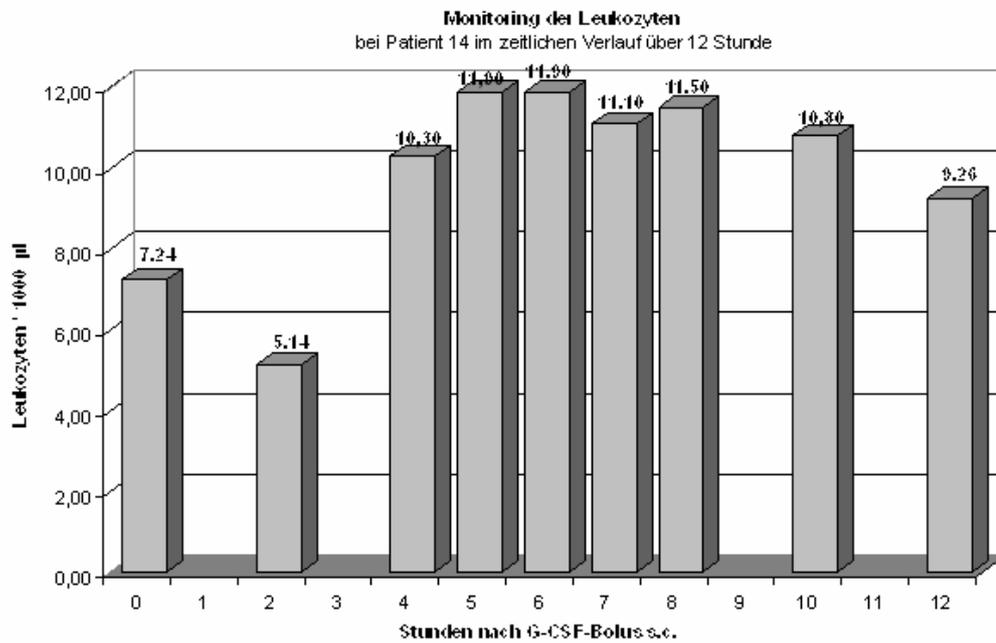
Leukozyten	*10 ³ /µl	7,24	5,14	10,30	11,90	11,90	11,10	11,50	10,80	9,26
Erythrozyten	*10 ⁶ /µl	3,01	2,91	2,87	3,14	2,84	2,76	2,77	2,86	2,94
Hb	g/dL	8,59	8,30	8,38	8,97	8,19	7,99	8,09	8,23	8,61
Hämatokrit	%	24,60	26,60	23,50	25,90	23,20	22,60	22,70	23,30	24,20
MCV	fL	81,10	81,10	81,90	82,40	81,90	82,00	81,80	81,50	82,30
MCH	pg	28,50	28,50	29,20	28,60	28,90	29,00	29,20	28,80	29,30
MCHC	g/dL	24,90	35,20	35,70	34,70	35,30	35,30	35,70	35,30	35,60
RDW	%	13,20	13,20	13,20	13,20	13,60	13,10	13,00	13,70	13,00
Thrombozyten	*10 ³ /µl	55,80	63,20	61,10	68,30	66,10	59,70	58,00	64,70	62,10
Lymhozyten	%	7,29	8,68	4,36	3,06	3,75	3,52	3,32	4,41	11,10
MID	%	23,00	23,10	22,80	24,60	20,50	20,90	2,76	18,80	12,70
Granulozyten	%	65,80	67,00	71,20	70,60	74,80	74,80	93,80	73,80	74,90
Lymphozyten	*10 ³ /µl	0,53	0,45	0,45	0,37	0,45	0,39	0,38	0,47	1,02
MID	*10 ³ /µl	1,67	1,19	2,35	2,93	2,43	2,32	0,32	2,02	1,17
Granulozyten	*10 ³ /µl	4,76	3,45	7,33	8,41	8,87	8,32	10,80	7,94	6,94
Total Counts:										
CD45+ (1)	Σ	19809	19881	19925	20312	19304	22542	10000	16826	24636
CD45+ (2)	Σ	19825	19842	19952	23048	32104		10000	17845	24476
CD45+ (3)	Σ	19828	19877	19949	20287	21354	20246	20020	23711	22290
CD34+ (1)	Σ	36	40	27	38	24	27	19	36	41
CD34+ (2)	Σ	44	31	20	34	48		11	36	50
CD34+ (3)	Σ	42	26	14	29	33	31	39	53	43
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,18	0,20	0,14	0,19	0,12	0,12	0,19	0,21	0,17
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,22	0,16	0,10	0,15	0,15		0,11	0,20	0,20
CD34+ Anteil an CD45+ (1)	%	0,21	0,13	0,07	0,14	0,15	0,15	0,19	0,22	0,19
CD34 abs(1)	Σ	13	10	14	22	15	13	22	23	15
CD34 abs(2)	Σ	16	8	10	18	18		13	22	19
CD34 abs(3)	Σ	15	7	7	17	18	17	22	24	18
Mittelwert		14,85	8,37	10,50	18,94	16,99	15,15	18,97	23,01	17,40

Leukozytenkonzentration

Minimum:	5,24 * 10 ³ /µl	(nach 2 h)	Maximum:	11,9 * 10 ³ /µl	(nach 5 h und 6 h)
Δ Max/Min abs:	6,66 * 10 ³ /µl		Δ Max/Min rel.:	% 127	
Δ Vor/Nach abs:	2,02 * 10 ³ /µl		Δ Vor/Nach rel.:	% 28	

CD34+ Zellkonzentration

Minimum:	8 /µl	(nach 2 h)	Maximum:	19 / µl	(nach 8 h)
Δ Max/Min abs:	11 /µl		Δ Max/Min rel.:	138 %	
Δ Vor/Nach abs:	2 /µl		Δ Vor/Nach rel.:	13 %	



7. Literaturverzeichnis

- Abrahamsen JF, Smaaland R, Sothorn RB, Laerum OD
Variation in cell yield and proliferativ activity of positive selected human CD34+ bone marrow cells along the circadian time scale
Eur J Haematol., Vol.60 No.1, pp 7-15
1998
- Ackermann H
Biometrie, 2. Auflage
Epsilon-Verlag Hochheim-Darmstadt
1997
- Anderlini P, Przepiorka D, Seong C, Smith TL, Huh YO, Lauppe J, Champlin R, Korbling M
Factors affecting mobilization of CD34+ cells in normal donar treated with filgrastim.
Transfusion 1997 May; 37(5): 507-512
1997
- Anderlini P, Korbling M, dale D et al.
Allogeneic blood stem cell transplantation: considerations for donors.
Blood 1997; 90: 903-908
1997a
- Arbona C, Prosper F, Benet I, Mena F, Solano C, Garcia-Conde J
Comparison between once a day vs. twice a day G-CSF for mobilization of peripheral blood progenitor cells in normal donors for allogenic PBPC transplantation.
Bone Marrow Transplantation 22(1):39-45, 1998 Jul
1998
- Aritomi M, Kunishima N et al.
Atomic structure of the G-CSF-receptor complex showing a new cytokine-receptor recognition scheme.
Nature 1999; 401(6754): 713-717.
1999
- Armitage S, Hargreaves R, Samson D, Brennan M, Kanfer E, Navarrete C
CD34 counts to predict the adequate collection of peripheral blood progenitor cells
Bone Marrow Transplant 1997 Oct; 20(7):587-591
1997
- Arpinati M, Green GL et al.
G-CSF mobilized T helper 2-inducing dentritic cells.
Blood 2000; 95:2484-2490.
2000
- Asano S
Human Granulocyte Colony-Stimulation Factor: Its basic aspects and clinical applications.
Am J Ped Haem Onc 1991, 13: 400 – 413
1991

- Auditore-Hargreaves K, Heimfeld S, Berenson RJ
 Selection and transplantation of hematopoietic stem and progenitor cells.
Bioconjugate Chemistry 1994 Jul-Aug; 5(4):287-300
 1994
- Bender JG, Unverzag KL, Walker DE, Lee W, Van Epps DE, Smith DH, Steward CC, To LB
 Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from
 normal peripheral blood and bone marrow using multicolour flow cytometry.
Blood 1991 Jun 15; 77(12):2591-2596
 1991
- Bensinger W, Appelbaum F, Rowley S, Storb R, Sanders J, Lilleby K, Gooley T, Demirer T,
 Schiffman K, Weaver C, Clift R, Chaucey T, Klarnet J, Montgomery P, Petersdorf S,
 Weiden P, Witherspoon R, Bruckner CD
 Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem
 cells.
J Clin Onc 13 (10):2547-2555
 1995
- Berenson RJ, Andrews RG, Bensinger WI, Kalamasz D, Knitter G, Bruckner CD,
 Bernstein ID
 Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons.
J Clin Invest 81: 951 -955
 1988
- Bernabeu C, Carrera AC, De Landazuri MO, Sanchez-Madrid F
 Centro de Investigaciones, Biologicas, C.S.I.C., Madrid, Spain.
 Interaction between the CD45 antigen and phytohemagglutinin. Inhibitory effect on
 the lectin-induced T cell proliferation by anti-CD45 monoclonal antibody.
Eur J Immunol 1987 Oct;17(10):1461-6
 1987
- Bernstein ID, Andrews RG, Zsebo KM
 Recombinant human stem cell factor enhances the formation of colonies by CD34+
 and CD34+lin-cells, and the generation of colony-forming cell progeny from CD34+
 lin- cells cultured with Interleukin-3, granulocyte colony-stimulating factor, or
 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.
Blood 1991 Jun 1; 77(11):2316-2321
 1991
- Bojko P, Stellberg W, Kudde C, Scharifi M, Herrmann M, Mayer S, Harstrick A, Seeber S
 Kinetic study of CD34+ cells during peripheral blood stem cell collection
J Clin Apheresis 14(1): 18-25
 1999
- Bokemeyer C, Kranz L
 Hochdosis-Chemotherapie - Neue Chancen und Risiken in der Onkologie
Arzneimitteltherapie; 15. Jahrgang, Heft 8, 1997; Seite 237-245
 1997
- Borleff JC, Bosschaert M, Vrehan HM, Schneider MM, van Strijp J, Small MK, Borkett
 KM
 Effect of escalating doses of recombinant human granulocyte colony-stimulating
 factor (filgrastim) on circulating neutrophils in healthy subjects.
Clin Ther 1998 Jul-Aug; 20(4): 722-736
 1989

- Canales MA, Fernandez-Jimenez MC, Martin A, Arrieta R, Caballero MD, Diez J, Quevedo E, Garcia-Bustos J, San Miguel JF, Hernandez-Navarro F
Identification of factors associated with poor peripheral blood progenitor cell mobilization in Hodgkin's disease.
Haematologica 2001 May;86(5):494-8
2001
- Caron H, Pearson A
Neuroblastoma
in:
Voute PA, Kalifa C, Barrett A: Cancer in Children; S. 274-291
Oxford University Press
1998
- Catlett JP, Leftwich JA, Westin EH, Grant S, Huff TF
c-kit expression by CD34+ bone marrow progenitors and inhibition of response to recombinant human interleukin-3 following exposure to c-kit antisense oligonucleotides.
Blood 1991 Dec 15; 78(12): 3186-3191
1991
- Cebon J, Nicola N, Ward M, Gardner I, Dempsey P, Layton J, Duhrsen U, Burges AW, Nice E, Morstyn G
Granulocyte-macrophage stimulating factor from human lymphocytes: the effect of glycolysation on receptor binding and biological activity
Journal of Biological Chemistry, No 256, pp 4483 - 4491
1990
- Charbonneau H, Tonks NK, Walsh KA, Fischer EH
The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase.
Department of Biochemistry, University of Washington, Seattle 98195.
Proc Natl Acad Sci USA 1988 Oct;85(19):7182-6
1988
- Cheng J, Baumhueter S, Cacalano G et al.
Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34.
Blood 1996; 87:479-490
1996
- Civin CL, Gore SD
Antigenic analysis of hematopoiesis: a review.
J Hematother 2: 137-144
1993
- Clement A, Coffe C, Adjizian JC, Villard F, Jolly D, Desbois I, Leon A
Peripheral stem cell collection, search for predictive factors: a multicenter study. Working Group on Transfusion and Therapeutic Techniques of the French Blood Transfusion Society.
Transfus Clin Biol 2000 Oct;7(5):485-96
2000

- Cull G, Ivey J, Chase P, Picciuto R, Herrmann R, Cannell P
Collection and recruitment of CD34+ cells during large-volume leukapheresis.
J Hematother 1997 Aug;6(4):309-14
- Curry JL, Trentin JJ
Hemopoietic spleen colony studies. I. Growth and differentiation.
Dev Biol 1967 May;15(5):395-413
1967
- Curry JL, Trentin JJ
Hemopoietic spleen colony studies. IV. Phytohemagglutinin and hemopoietic regeneration.
J Exp Med 1967 Nov 1;126(5):819-32
1967
- Curry JL, Trentin JJ, Cheng V
Hemopoietic spleen colony studies. 3. Hemopoietic nature of spleen colonies induced by lymph node or thymus cells, with or without phytohemagglutinin.
J Immunol 1967 Nov;99(5):907-16
1967a
- Curry JL, Trentin JJ, Wolf N
Hemopoietic spleen colony studies. II. Erythropoiesis.
J Exp Med 1967 Apr 1;125(4):703-20
1967b
- Dancey JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA
Neutrophil kinetics in man.
J Clin Invest 1976 Sep;58(3):705-15
1976
- Daneker GW, Lund SA, Caughman SW, Swerlick RA, Fischer AH, Staley CA, Ades EW
Culture and characterization of sinusoidal endothelial cells isolated from human liver.
Department of Surgery, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia 30322, USA.
In Vitro Cell Dev Biol Anim 1998 May;34(5):370-7
1998
- D'Arena G, Musto P, Di Mauro L, Cascavilla N, Iacono ND, Scalzulli PR, Matera R, Carotenuto M
Predictive parameters for mobilized peripheral blood CD34+ progenitor cell collection in patients with hematological malignancies.
Am J Hematol 1998 Aug;58(4):255-62
1998
- de la Rubia J, Arbona C, de Arriba F, del Canizo C, Brunet S, Zamora C, Diaz MA, Bargay J, Petit J, de la Serna J, Insunza A, Arrieta R, Pascual MJ, Serrano D, Sanjuan I, Espigado I, Alegre A, Martinez D, Verdeguer A, Martinez C, Benlloch L, Sanz MA
Analysis of factors associated with low peripheral blood progenitor cell collection in normal donors.
Transfusion 2002 Jan;42(1):4-9
2002

- Delia D, Lampugnani MG, Rasnati M, Dejana E, Aiello A, Fontanella E, Soligo D Pierotti MA, Greaves MF
 CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro.
 Blood 1993, Feb 15; 81(4):1001-1008
 1993
- Demeocq F, Kanold J, Chassagne J, Bezou MJ, Lutz P, deLumley L, Philip I, Vannier JP, Marguerite G, Lamagnere JP, Baranzelli MC, Lenat A, Carla H, Malpuech G
 Successful blood stem cell collection and transplantation in children weighing less than 25 kg.
 Bone Marrow Transplantation 13, 43-50
 1994
- Demetri GD, Griffin JD
 Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor.
 Blood 1991; 78: 2791-2808
 1991
- Dexter TM
 Stem cells in normal growth and disease.
 Br Med J (Clin Res Ed) 1987 Nov 7;295(6607):1192-4
 1987
- Diaz MA, Alegre A, Villa M, Granda A, de la Vega A, Ramirez M, Ruano D, Gonzalez A, Merino JM, Madero L
 Pediatric experience with autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: influence of CD34+ cell dose in engraftment kinetics.
 Bone Marrow Transplantation 1996 Oct; 18(4): 699-703
 1996
- Diaz MA, Villa M, Alegre A, Lamana ML, de la Vega A, Granda A, Madero L
 Collection and transplantation of peripheral blood progenitor cells mobilized by G-CSF alone in children with malignancies.
 British Journal of Haematology 96, 148-154
 1996a
- Diaz MA, Villa M, Madero L, Benito A, Alegre A, Fernandez-Ranada JM
 Analysis of engraftment kinetics in pediatric patients undergoing autologous PBPC transplantation.
 J Hematother; 1998 Aug. Vol 7, Issue 4 P 367-373
 1998
- Diaz MA, Alegre A, Benito A, Villa M, Madero L
 Peripheral blood progenitor cell collection by large-volume leukapheresis in low-weight children.
 J Hematother 1998 Feb; 7(1): 63-68.
 1998a
- Diaz MA, Garcia-Sanchez F, Lillo R., Vincent MG, Cicario JL, Madero L
 Large-volume leukapheresis in pediatric patients: pre-apheresis peripheral blood CD34+ cell count predicts progenitor cells yield off.
 Hematologica 1999 Jan; 84 (1):32-35
 1999

- Drepper, Uta
 Zytophysiologie und Zytochemie der CD34+ menschlichen hämatopoetischen Stammzelle.
 Dissertation Universität Köln(1998)
 1998
- Dreger P, Haferlach T, Eckstein V, Jacobs S, Suttrop M, Löffler H, Müller-Ruchholtz W, Schmitz N
 G-CSF-mobilized peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: safety, kinetics of mobilization, and composition of the graft.
 Brit J Hematol 87:609-613
 1994
- Dreger P, Schmitz N
 Stem Cell Mobilization in Healthy Donors: Current Status
 Infusionsther Transfusionsmed 26:92-95
 1999
- Duhrsen U, Villeval JL, Boyd J, Kannourakis G, Morstyn G, Metcalf D
 Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients.
 Blood, Vol. 72, Issue 6, pp 2074-2081; 12/01/1988
 1988
- Eckardt R:
 Durchflußzytometrie, eine schnelle und einfache Methode zur Analyse großer Zellzahlen
 Laboratoriumsmedizin 15: 563, 1991
 1991
- Eckardt R: Grundlagen der Durchflußzytometrie.
 Coulter EPICS Systeme
 1993
- Eguchi K, Shinkai T, Sasaki T, Tamura T, Ohe Y, Nakagawa K, Fukuda M, Yamada K, Kojima A, Oshita F, Morita M, Suemasu K, Saijo N
 Subcutaneous administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in intensive chemotherapy for patients with advanced lung cancer.
 Jpn J Cancer Research 81: 1168
 1990
- Elfenbein GJ, Janssen WE, Perkins JB, Partyka JS, Fields KK
 Mathematical Modelin of Human Hematopoiesis: lessons Learnd from Bedside Following Autologous Peripheral Blood Stem Cell Tranplants.
 ABMT 1995
- Favre G, Passweg J, Hoffmann T, Speck B, Gratwohl A, Tichelli A
 Immunophenotype of blast crisis in chronic myeloid leukaemia
 Schweizer Medizinische Wochenschrift 1998 Oct 17; 128(42): 1624-1626
 1998
- Fischer J, Unkrig U, Ackermann M, Frick M, Giers G
 Intra-Day CD34+ cell counts depend on the timing to application and correlate with the resulting G-CSF plasma level after steady-state mobilization of PBPC ba filgrastim.
 ASH 1994

- Fischmeister G, Kurz M, Haas OA, Michsche M, Buchinger P, Printz D, Ressmann G, Stroebel T, Peters C, Fritsch G, Gadner H
G-CSF versus GM-CSF for stimulation of peripheral blood progenitor cells (PBSC) and leukocytes in healthy volunteers: comparison of efficacy and tolerability.
Ann Hematol (1999) 78: 117-123
1999
- Fukuda J, Kaneko T, Egashira M, Oshimi K
Direct measurement of CD34+ blood stem cell absolute counts by flow cytometry.
Stem Cells (1998);16(4):294-300
1998
- Fukuda M, Sasaki H, Fukuda MN C.A. Baldamus, P.Scigalla, L.Wieczorek, K.M. Koch,
Erythropoietin metabolism and the influence of carbohydrate structure.
Erythropoietin: from Molecular Structure to Clinical Application, pp 76, 78-89,
Karger, Basel
1989
- Glaspy JA
The Impact of CD34+ cell dose on engraftment
AMGEN Perspectives on PBSC
1997
- Glaspy JA, Shpall EJ, LeMaiste RA, Bridell RA, Menchaca DM, Turner SA, Lill M, Chap L,
Jones R, Wiers MD, Sherian WP, McNierce IK
Peripheral blood progenitor cell mobilization using stem cell factor in combination with
filgrastim in breast cancer patients
Blood 90:2939
1997
- Goldschmidt H, Hegenbart Z, Haas R, Hunsein W
Mobilization of peripheral blood progenitor cells with high-dose cyclophosphamide (4
or 7 g/m²) and granulocyte colony-stimulating factor in patients with multiple
myeloma.
Bone Marrow Transplant 17: 691-697
1996
- Gramatzki M, Valerius T
Antikörper als spezifische Tumortherapeutika
Der Internist 38: 1055 - 1062
1997
- Greaves MF, Brown J, Molgaard HV, Spurr NK, Robertson D, Delia D, Sutherland DR
Molecular features of CD34: a hemopoietic progenitor cell-associated molecule.
Leukemia 1992; 6:31-36
1992
- Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM
Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells.
J Cell Physiol 2001 Oct;189(1):54-63
2001

- Groopman JE, Moline JM, Scadden DT
Hematopoietic growth factors. Biology and clinical applications.
N Engl J Med 321(21):1449-1459
1989
- Gutensohn K, Serke S, Kretschmer V
Durchflußzytometrische Analyse CD34-exprimierender hämatopoetischer Zellen in
Blut und Zytaphereseprodukten.
Berlin, Marburg, Infusionstherapie und Transfusionsmedizin , Sonderdruck 23/S2/96
1996
- Haas R, Mohle R, Fruhauf S, Goldschmidt H, Witt B, Flentje M, Wannemacher M,
Hunstein W
Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of
peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma.
Blood 1994 Jun 15;83(12):3787-94
1994
- Hall PA, Watt FM
Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity.
Keratinocyte Laboratory, Imperial Cancer Research Fund, London, UK
Development 1989 Aug.;106(4):619-33
1989
- Hansson M, Svensson A, Engervall P, Bjorkholm M, Gruber A, Soderstrom T
Increase of monocytes predicts mobilization of peripheral stem and progenitor cells
after chemo therapy followed by G-CSF administration.
European Journal of Hematology 1995 May; 54(5):321-328
1995
- Hartmann O, Le Corroller AG, Blaise D, Michon J, Philip I, Norol F, Javier M, Pico JI, #
Baranzelli MC, Rubi H, Coze C, Pinna A, Meresse V, Benhamoue E
Peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation for solid tumors and
lymphomas: hematologic recovery and costs. A randomised, controlled trial.
Annals of Internal Medicine 126, 600-607
1997
- Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T
The stem cells antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion.
Proc Natl Acad Sci USA 1995 19;92(26): 12240-12244
1995
- Höglund M, Smedmyr B, Simonsson B, Tötterman T, Bengtsson M
Dose-dependent mobilisation of haematopoietic progenitor cells in healthy volunteers
receiving glycosylated rHuG-CSF
Bone Marrow Transplant 1996 Jul; 18(1) 19-27
1996
- Höglund M, Smedmyr B, Bengtsson M, Tötterman T, Cour-Chabernaud V, Yver A,
Simonson B
Mobilization of CD34+ cells by glycosylated and nonglycosylated G-CSF in healthy
volunteers - a comparative study.
Eur J Hematol 59:177-183
1997

- Janeway CA, Travers P, Walpot M, Shlomchik M
 Immunologie, 5. Auflage
 Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg/Berlin
 2002
- Jilma B, Hergovich N, Stohlawetz P, Eichler HG, Bauer P, Wagner OF
 Circadian variation of granulocyte colony stimulating factor levels in man.
 Br J Haematol No.106(2); pp 368-370
 1999
- Johnsen HE, Baech J, Nikolajsen K
 Validation of the Nordic Flow Cytometry Standard for CD34+ Cell Enumeration in
 Blood and Autografts: Report from the Thrid Workshop
 Journal of Hemathotherapy 8:15-28.
 1999
- Kanaju T, Okamura T, Nagafuji K et al
 Megakaryocytes produce the receptor for granulocyte colony-stimulating factor.
 Blood 1995; 85:3359-60
 1995
- Kanold J, Berger M, Halle P, Rapatel C, Schoepfer C, de Lumley L, Vannier JP, Lutz P,
 Plantaz D, Stephan JL, Malpuech G, Demeocq F
 Kinetics of hematopoietic progenitor cell release induced by G-CSF alone in children
 with solid tumors and leukemias.
 Bone Marrow Transplant. 21 (1): 59 - 63; 1998 Jan
 1998
- Karow T, Lang R
 Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.
 Auflage 9 (2001), S. 609 - 6.10
 2001
- Kasparu H, Krieger O, Girschikofsky M, Kolb A, Bettelheim F, Lutz D
 Factors infulencing the timing of peripheral blood stem cell collection (PBSC).
 Transfus Sci 1996 Dec; 17(4):595-600
 1996
- Kato K, Radbruch A
 Isolation and characterization of CD34+ hematopoietic stem cells from human
 peripheral blood by high-gradient magnetic cell sorting.
 Cytometry 1993;14(4):384-92
 1993
- Kawano Y, Takaue Y, Watanabe T, Watanabe A, Iwai A, Kuroda Y
 Peripheral blood stem cell mobilization with granulocyte colony-stimulating factor and
 a harvesting procedure in pediatric donors.
 Bone Marrow Tranplant 1998 Jun; 21 Suppl 3: S32-34
 1998

- Kawano Y, Takaue Y, Wantanabe T, Abe T, Okamoto Y, Iwai T, Wanatabe A, Tio E, Makimoto A, Nakagawa R, Wanatabe H, Sato J, Suenaga K, Suzuya H, Ohnishi T, Kanamaru S, Kaneko M, Kuroda Y
Efficacy of the mobilization of peripheral blood stem cells by granulocyte colony-stimulating factor in pediatric donors.
Cancer Reserch, 1999 Jul 15; 59(14):3321-4
1999
- Khwaja A, Cerver J, Jones HM et al.
Expression and dynamic modulation of the human granulocyte colony-stimulating factor receptor in immature and differentiated myeloid cells.
Brit J Haemat 1993; 85: 254-259
- Kiefer T, Kalusche EM, Schüler F, Hutzschenreuter U, Schwenke M, Dölken G
Circadian variations of circulating CD34+ cell numbars agfter chemotherapy plus G-CSF in patients with breast cancer
Okologie 20, Supl. 1, #344
1997
- Kishita M, Motojima H, Oh-eda M, Kojima T, Kamachi S, Fukushima M, Ono M
Stability of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in serum.
The Clinical Report, No. 26, 221
1992
- Knudsen LM, Gaarsdal E, Jensen L, Nielsen KJ, Nikolaisen K, Johnson HE
Improved priming for mobilization of and optimal timing for harvest of peripheral blood stem cells.
J Hemathother 1996 Aug; 5(4):399-406
1996
- Knudsen LM, Gaarsdal E, Jensen L, Nikolaisen K, Johnsen HE
Evaluation of mobilized CD34+ cell counts to guide timing and yield of large-scale collection by leukapheresis.
J Hematother 1998 Feb;7(1):45-52
1998
- Köchling G, Legat D, Weber BE, Stöckl E, Dresel L, Schirrmeister A, Hirsch FW
Circadian Variations of CD34+ Cell-Concentrations Followinf Mobilization with Chemotherapy and Filgrastim
Onkologie 20, Supl. 1, #343
1997
- Kröger N, Zeller W, Hassan TH, Krüger W, Löliger C, Zander AR
Schedule-Dependency of G-CSF in peripheral blood progenitor cell mobilization in breast cancer patients.
Blood, Vol. 91, No. 5, pp 828-1830
1998
- Kurekci AE, Kiss JE, Koehler M
Mobilization of peripheral blood progenitor cells using 16 versus 10 mg/kg/d G-CSF in children with malignancies.
Pediatr Transplant 1998 May 2(2): 160-4
1998

- Lanza F, Piacibello W
 New insights into the characterization and ex vivo manipulation of CD34+ Cells
 Haematologica - Journal of Hematology on Internet
 Supplemet 2
- Largiadèr F, Metzger U
 Allgemeine chirurgische Onkologie und TNM-System
 in: Berchhold, Hamelmann, Peiper, Trentz , Chirurgie, 3.Auflage, Urban&Fischer,
 1999
- Layton JE, Hockman H, Sheridan WP, Morstyn G
 Evidence for a novel in vivo control mechanism of granulopoiesis: Mature cell-related
 control of a regulatory growth factor.
 Blood 74; 1303
 1989
- Layton JE, Shimamoto G et al.
 Interaction of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) with receptor. Evidence
 that Glu 19 of G-CSF interacts with Arg288 of the receptor.
 J Biol Chem 1999; 274(25): 17445-17451
 1999
- Lee V, Li CK, Shing MM, Chik KW, Li K, Tsang KS, Zhao DC, Lai DH, Wong A, Yuen PM
 Singel vs. twice daily G-CSF dose for peripheral blood stem cells harvest in normal
 donors and children with non-malignant diseases.
 Bone Marrow Transplantation 25, 931-935
 2000
- Lemoli RM, Tafuri A, Fortuna A, Catani L, Rondelli D, Ratta M, Tura S
 Biological characterization of CD34+ cells mobilized into peripheral blood.
 Bone Marrow Transplantation (1998) 22, Suppl 5, S. 47-50
 1998
- Lichterfeld M, Martin S et al.
 Mobilization of CD34+ haematopoietic stem cells is associated with a functional
 inactivation of the integrin very late antigen 4.
 Brit J Heamtol 2000; 110(1): 71-81
 2000
- Locatelli F, Perotti C, Zecca M, Pedrazzoli P
 Transplantation of peripheral blood stem cells mobilized by haematopoietic growth
 factors in childhood.
 Bone Marrow Transplant. (1998) 22, Suppl. 5: S51-55
 1998
- Loken MR, Shah VO, Hollander Z, Civin CI
 Flow cytometric analysis of normal B lymphoid development.
 Pathol Immunopathol Res 1988;7(5):357-70
 1988

- Lydaki E, Bolonaki E, Stiakaki E, Dimitriou H, Kalmantis T, Kalmanti M
Efficacy of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor and recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor in neutropenic children with malignancies
Pediatr Hematol Oncol 1995 Nov-Dec; 12(6): 551-558
1995
- Madero L, Villa M, Gonzales M, Dias MA
Peripheral blood progenitor cells for autologous transplant in children.
Bone Marrow Transplant 1998 Apr; 21 Suppl 2:S8-10
1998
- Martinez C, Sureda A, Martino R, Cancelas JA, Madoz P, Garcia J, Brunet S
Efficient peripheral blood stem cell mobilization with low-dose G-CSF (50 µg/m²) after salvage chemotherapy for lymphoma
Bone Marrow Transplant 1997 Nov; 20(10): 855-858
1997
- Moesteller RD
Simplified calculation of body surface area
New England Journal of Medicine 317: 1098
1987
- Münteferbung H, Riede UN, Christ B
Fehlbildungen. S. 308-312
in Riede UN, Schaefer HE: Allgemeine und Spezielle Pathologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 4.Aufl.
1995
- Narayanasami U, Kanteti R, Morelli J, Klekar A, Al-Olama A, Keating C, O'Connor C, Berkman E, Erban JK, Sprague KA, Miller KB, Schenkein DP
Randomized trial of filgrastim versus chemotherapy and filgrastim mobilization of hematopoietic progenitor cells for rescue in autologous transplantation.
Blood 2001 Oct 1;98(7):2059-64
2001
- Nissen C, Dalle Carbonare V, Moser Y
In vitro comparison of the biological potency of glycosylated versus nonglycosylated rG-CSF.
Drug Investigation 7, pp 346-352
1990
- Ogawa M
Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells.
Ralph H. Johnson Department of Veterans Affairs Medical Center, Charleston, SC 29401-5799.
Blood 1993 Jun 1;81(11):2844-53
1993
- Ohdo S, Arata N, Furukubo T, Yukawa E, Higuchi S, Nakano S, Ogawa N
Chronopharmacology of granulocyte colony-stimulating factor in mice.
J Pharmacol Exp Ther, No 285(1), pp 242-246
1998

- Ohdo S, Arata N, Furukubo T, Yukawa E, Higuchi S, Nakano S, Ogawa N
Influence of dosing time on pharmacological action of G-CSF in mice
Life Sci ; 62(12): pp 163-168
1998a
- Olivieri A, Offidani M, Ciniero L, Poloni A, Masia MC, Salvi A, Leoni P
Optimization of the yield of PBSC for autotransplantation mobilized by high-dose chemotherapy and G-CSF: proposal for a mathematical model.
Bone Marrow Transplant 1994 Aug;14(2):273-8
1994
- Park LS, Urdal DL
Colony-stimulating factor receptors.
Trans Proc 1989; 21: 54-56.
1989
- Perentesis J, Katsanis E, DeFor T, Negalia J, Ramsay N
Autologous stem cell transplantation for high-risk pediatric solid tumors.
Bone Marrow Transplant 24(6): 609-615
1999
- Petros WP
Pharmacokinetics and Administration of Colony-Stimulating Factors
Pharmacotherapy 1992 (2Pt2); 12: 23S-38S
1992
- Pezzutto A
Immuntherapie: Zytokine und Tumorzellvakzine
Der Internist 1998; 39: 1131 - 1138
1998
- Platzer E
Human hemopoietic growth factors
Eur J Haematol 42(1): 1-15
1989
- Pulido R, Lacal P, Mollinedo F, Sanchez-Madrid F
Biochemical and antigenic characterization of CD45 polypeptides expressed on plasma membrane and internal granules of human neutrophils.
FEBS Lett 1989 Jun 5;249(2):337-42
1989
- Riede UN, Saeger W:
Nebennierenmark, S.87 - 988
in Riede UN, Schaefer HE: Allgemeine und Spezielle Pathologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 4.Aufl.
1995
- Roilides E, Walsh TJ, Pizzo PA, Rubin M
Granulocyte colony-stimulating factor enhances the phagocytic and bactericidal activity of normal and defective human neutrophils.
J Infect Dis 1991 Mar; 163(3): 579-583
1991

- Rondelli D, Andrews RG, Hansen JA, Ryncarz R, Faerber MA, Anasetti C
 Division of Clinical Research, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA
 98104, USA.
 Alloantigen presenting function of normal human CD34+ hematopoietic cells.
 Blood 1996 Oct 1;88(7):2619-75
 1996
- Rosenfeld CS, Sulecki M, Evans C, Shadduck RK
 Comparison of intravenous versus subcutaneous recombinant human granulocyte-
 macrophage colony-stimulating factor in patients with primary myelodysplasia.
 Esp Hematl 1991; 19: 273 - 277
 1991
- Sachs L
 Angewandte Statistik, 8. Aufl.
 Springer Verlag Berlin, Heidelberg
 1996
- Schmitz N, Linch DC, Dreger P, Goldstone AH, Boogaerts MA, Ferrant A, Demuyck HMS,
 Link H, Zander A, Barge A, Borkett K
 Randomised trial of filgrastom-mobilised peripheral blood progenitor cell
 transplantation versus autologous bone-marrow transplantation in lymphoma
 patients.
 Lancet 1996; 347: 353-357
 1996
- Schuld A, Mullington J, Hermann D, Hinze-Selch D, Fenzel T, Holsboer F, Pollmacher T
 Effects of granulocyte colony-stimulating factor on night sleep on humans.
 Am J Physiol 1999 Apr; 276(4 Pt 2): R1149-1155
 1999
- Schwella N, Huhn D
 Mobilisation und Separation autologer Blutstammzellen
 Der Onkologe 7-98, S. 639- 648
 1998
- Serke S, Säuberlich S, Huhn D
 Multiparameter flow-cytometrical quantitation of circulating CD34+ cells: correlation of
 the quantitation of circulating haemopoietic progenitor cells by in vitro colony assay.
 Br J Haematol 77 (1991): 453
 1991
- Shimoda K, Okamura S, Harada N et al.
 Identification of a functional receptor for granulocyte colony-stimulating factor on
 platelets.
 J Clin Invest 1993; 91: 1310-1313
 1993
- Smolowicz AG, Villman K, Berlin G, Tidefelt U
 Kinetics of peripheral blood stem cell harvests during a single apheresis.
 Transfusion 1999 Apr;39(4):403-9
 1999

- Stachel D
 Stammzelltransplantation. Teil 1: Verfahren, Indikation, Ablauf, Fremdspende
 Monatsschrift Kinderheilkunde 1999; 147 (7): 707 - 715
 1999
- Stute N, Santana V; Rodman JH, Schell MJ, Ihle JN, Evans WE
 Pharmacokinetics of Subcutaneous Recombinant Human Granulocyte Colony-
 Stimulating Factor in Children
 Blood 79 (11): 2849 - 2854
 1992
- Sugiura K, Pahwa S, Yamamoto Y, Borisov K, Pahwa R, Nelson RP Jr, Ishikawa J, Iguchi T,
 Oyaizu N, Good RA, Ikehara S
 Characterization of natural suppressor cells in human bone marrow.
 Stem Cells 1998;16(2):99-106
 1998
- Sutherland DR, Keating A
 The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications.
 Journal of Hematotherapy 1992; 1:115-129
 1992
- Symons A, Willis AC, Barclay AN
 Domain organization of the extracellular region of CD45.
 Protein Eng 1999 Oct;12(10):885-92
 1999
- Teofili L, Iovino MS, Sica S, Pierelli L, Menichella G, De Stefano V, Rumi C, Leone G
 Characterization of peripheral blood CD34+ progenitor cells mobilized with
 chemotherapy and granulocyte colony-stimulating factor.
 Exp Hematol 1994 Sep;22(10):990-5
 1994
- Thiele J, Wickenhauser C, Baldus SE, Kuemmel T, Zirbes TK, Drebber U, Wirtz R, Thiel A,
 Hansmann ML, Fischer R
 Characterization of CD34+ human hemopoietic progenitor cells from the peripheral
 blood: enzyme-, carbohydrate- and immunocytochemistry, morphometry, and
 ultrastructure.
 Leuk Lymphoma 1995 Feb;16(5-6):483-91
 1995
- Till JE, McCulloch EA
 Hemopoietic stem cell differentiation.
 Biochim Biophys Acta 1980 Nov 26;605(4):431-59
 1980
- To LB, Shepperd M, Haylock DN et al.
 Single high dose of cyclophosphamids enable the collection of high numbers of
 hemopoietic stem cells from the peripheral blood
 Exp Hematol 18: 442-447
 1990
- To LB, Haydock DN, Simmons PJ, Juttner CA
 The biology and clinical uses of blood stemm cells
 Blood 89: 2233 - 2258
 1997

- Trentin JJ
 Determination of bone marrow stem cell differentiation by stromal hemopoietic inductive microenvironments (HIM)
 American Journal of Pathology 1971 Dec; 65(3):621-628
 1971
- Urashima M, Kato Y, Hoshi Y, Deguchi Y, Kamijo M, Uchiyama H, Fujisawa K, Akatsuka J, Maekawa K
 Factors affecting the efficiency of peripheral blood stem cell collection in children treated with chemotherapy and G-CSF.
 Acta Paediatr Jpn 1994 Apr; 36(2): 151-161
 1994
- Van Epps DE, Bender J, Lee W, Schilling M, Smith A, Smith S, Unverzagt K, Law P, Burgess J
 Harvesting, characterization, and culture of CD34+ cells from human bone marrow, peripheral blood, and cord blood.
 Blood Cells 1994;20(2-3):411-23
 1994
- Vantelon JM, Koscielny S, Brault P, Bourhis JH, Ribrag V, Pico J, Fenaux P, Munck JN
 Scoring system for the prediction of successful peripheral blood stem cell (PBSC) collection in non-Hodgkin's lymphoma (NHL): application in clinical practice.
 Bone Marrow Transplant 2000 Mar; 25(5): 495-499
 2000
- Van Zant G, Goldwasser E
 Competition between erythropoietin and colony-stimulating factor for target cells in mouse marrow.
 Blood 1979 May;53(5):946-65
 1979
- Yu J, Leisenring W, Bensinger WI, Holmberg LA, Rowley SD
 The predictive value of white cell or CD34+ cell count in the peripheral blood for timing apheresis and maximizing yield.
 Transfusion 1999 May;39(5):442-50
 1999
- Wang Q, Zhang W, Ding G, Sun L, Chen And G, Cao X
 Dendritic cells support hematopoiesis of bone marrow cells1.
 Transplantation 2001 Sep 15;72(5):891-9
 2001
- Watts MJ, Addison I, Ings SJ, Long SG, Hartley S, Warrington S, Boyce M, Linch DC
 Crossover study of the haematological effects and pharmacokinetics of glycosylated and non-glycosylated G-CSF in healthy volunteers.
 Brit J Haemat 1997; 98: 474-479
 1997
- Watts MJ, Addison I, Ings SJ, Long SG, Hartley S, Warrington S, Boyce M, Linch DC
 Optimal timing for collection of PBPC after glycosylated G-CSF administration.
 Bone Marrow Transplant 1998 Feb;21(4):365-8
 1998

- Waever CH, Hazelton B, Birch R, Palmer P, Allen C, Schwartzberg I, West W
 Analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after administration of myeloablative chemotherapy.
 Blood 86, 361-3969
 1995
- Weaver CH, Birch R, Greco FA, Schwartzberg L, McAneny B, Moore M, Oviatt D, Redmond J, George C, Alberico T, Johnson P, Buckner CD
 Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells: randomized evaluations of different doses of filgrastim.
 British Journal of Haematology 1998; 100: 338-347
 1998
- Weber B
 Mobilisierung von hämatopoetischen Stammzellen mit GM-CSF und G-CSF bei Patienten nach Polychemotherapie
 Inauguraldissertation der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau
 1993
- Woods PA
 Chronotherapy of growth factors.
 J Infus Chemother, 5(1); pp 20-23
 1995
- Woods PA, Hrushesky WJM, Klevecz R
 Distinct circadian time structures characterize myeloid and erythroid progenitor and multipotent clonogenicity as well as marrow precursor proliferation dynamics
 Experimental Hematology, Vol.26, No. 6, pp 523-533
 1998
- Yu J, Leisenring W, Bensinger WI, Holmberg LA, Rowley SD
 The predictive value of white cell or CD34+ cell count in the peripheral blood for timing apheresis and maximizing yield.
 Transfusion 1999 May; 39(5):442-450
 1999
- Zarco MA, Ribera JM, Urbano-Ispizua A, Filella X, Arriols R, Martinez C, Feliu E, Montserrat E
 Phenotypic changes in neutrophil granulocytes of healthy donors after G-CSF administration.
 Haematologica 1999 Oct; 84(10): 874-878
 1999
- Zeller W, Gutensohn K, Stockschrader M, Dierlamm J, Kroger N, Koehne G, Hummel K, Kabisch H, Weh HJ, Kuhn P, Hossfeld DK, Zander AR
 Increase of mobilized CD34-positive peripheral blood progenitor cells in patients with Hodgkin's disease, non-Hodgkin's lymphoma, and cancer of the testis.
 Bone Marrow Transplant 1996 May; 17(5): 709 – 713
 1996

8. Danksagung

Mein vornehmlichster Dank gilt Frau Dr. Ulrike Köhl, die mir als Arbeitsgruppenleiterin und Mentorin durch ihre hervorragende Planung und Betreuung die Möglichkeit zur Realisierung dieses Projektes gegeben hat. Durch ihre besondere Gabe, die individuellen Stärken und Fertigkeiten ihrer Mitarbeiter zu fördern, und durch ihren offenen, ehrlichen und menschlichen Umgang in jeder Phase des Projektes wurde mir ein einzigartiger Einblick in die Wissenschaft gewährt, für den ich besonders dankbar bin.

Vielen Dank auch an Herrn PD Dr. Schwabe, meinen Doktorvater, der seine brillante Analytik und Kritik stets mit einer Prise Humor zu würzen wußte und vor dessen klinischem und wissenschaftlichem Genius ich mich in Ehrfurcht verneige.

Für die Unterstützung im institutionellen Rahmen der Klinik III der Universitäts-Kinderklinik, welche mir überhaupt erst die Möglichkeit eröffnete, eine solche Arbeit durchzuführen und eine Brücke zwischen Labor und Klinik zu schlagen, bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. B. Kornhuber und Herrn Prof. T. Klingebiel, ebenso wie für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die stete Förderung.

Ein besonderes Dankeschön für die enge Zusammenarbeit in Planung, Durchführung und Auswertung gilt meinen Kolleginnen Frau Dr. Claudia Andreas und Frau Dr. Stephanie Zimmermann, die zu jeder Zeit wichtige Ansprech- und Diskussionspartnerinnen waren.

Für ständige Anregung und rege Anteilnahme an dem Projekt, für Hilfe, Rat und Tat im Labor sei vielmals gedankt: Frau Dr. Ruth Esser, Frau Andrea Brinkmann, Frau Stefanie Grohal, Herrn Dr. Eckhard Rohrbach und allen weiteren involvierten medizinisch-technischen Assistentinnen und wissenschaftlichen Mitarbeitern. Des weiteren bedanke ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen sowie dem Pflegepersonal auf den Stationen 34-4 und 31-3 für die Hilfe bei der Organisation und Durchführung des klinischen Monitoring, insbesondere bei Frau Dr. Martina Becker, Schwester Susanne Rohrbach (geb. Eggebrecht) und Schwester Patricia Rebehn.

Ich danke zudem ganz herzlich Prof. Michael Sachs und Herr Oberarzt Sörensen, meinen Mentoren in allen ärztlichen und philosophischen Fragen, die mich auch während der Beschäftigung mit wissenschaftlichen Fragestellungen nie das Wesentliche aus den Augen haben verlieren lassen: den Menschen.

Auch möchte ich meiner Frau Anja Holzapfel sowie meinen Eltern Monika und Martin Bochennek, meinem Bruder Robert Bochennek und meinem langjährigen Freund und Kollegen Boris Wittekindt für den Rückhalt, die Inspiration und die Unterstützung danken.

Schließlich will ich den Patientinnen und Patienten sowie deren Eltern meinen Dank aussprechen, ohne deren Hilfe eine solche klinische Studie in ihrer Durchführung unmöglich gewesen wäre und die mit ihrer Zeit und ihrem Blut dazu beigetragen haben, dass eine Optimierung des Apheresezeitpunktes nicht nur für sie selbst, sondern auf für folgende Generationen von Patientinnen und Patienten möglich geworden ist.

9. Lebenslauf

Konrad Lucius Bochennek

13. Dezember 1974 geboren in Frankfurt am Main als erstes Kind des Elektronikers Martin Bochennek aus Peiskretscham und der Diplom-Volkswirtschaftlerin Monika Bochennek geb. Dlugosch aus Klosterbrück
Bruder: Robert Bochennek
- 1981 - 1985 Besuch der Heinrich-Kromer-Grundschule in Frankfurt am Main
- 1984 - 1994 Besuch des Ziehen-Gymnasiums in Frankfurt am Main mit Abschluss Abitur (Leistungskurse in Mathematik und Religion)
- 1994 - 1996 Zivildienst an der Heinrich-Steul-Schule in Frankfurt (Schule für geistig und körperlich behinderte Kinder)
- 1996 - 2001 Studium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main
Abschluss der ärztlichen Vorprüfung 1998
Abschluss des ersten Abschnitts der ärztlichen Prüfung 1999
Abschluss des zweiten Abschnitts der ärztlichen Prüfung 2001
Abschluss des dritten Abschnitts der ärztlichen Prüfung 2002
- 2001-2002 Absolvierung des Praktischen Jahrs an der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main
In den Fächern Kinderheilkunde, Innere Medizin und Chirurgie
- 2003 Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Klinik III des Zentrums für Kinder- und Jugendheilkunde der Universitätsklinik der J.W.Goethe-Universität unter Leitung von Prof. Dr. T. Klingebiel.

Frankfurt am Main, den 10.02.2004



10. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel

**Monitoring der
Mobilisierung CD34+ hämatopoetischer Stammzellen
mit G-CSF bei pädiatrisch-onkologischen Patienten vor autologer
Stammzelltransplantation**

im Zentrum der Kinderheilkunde der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Klinik III (Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie und, Direktor: Prof. Dr. T. Klingebiel) unter der Leitung von Privatdozent Dr. med. D. Schwabe und mit Unterstützung von Frau Dr. U. Köhl ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 10.02.2004

