

**Charakterisierung und Funktionstestung von Granulozytenpräparaten
in vitro und ex vivo im Rahmen einer klinischen Studie**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2002

vorgelegt von
Katja Joos

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.02

Dekan: Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatterin: PD Dr. B. Neumeister

2. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Laufer

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----------|
| I Einleitung | 1 |
| 1. Einführung | 1 |
| 2. Allgemeines | 1 |
| 2.1 Granulozyten und ihre Funktion im Immunsystem | 1 |
| 2.1.1 Hämatopoetische Abstammung | 1 |
| 2.1.2 Granulozytäre Funktionen | 2 |
| 2.2 Oberflächenantigene | 4 |
| 2.3 Zytokine | 5 |
| 2.4 Stimulus-response-coupling | 7 |
| 3. Geschichte der Granulozytenfunktion | 7 |
| 3.1 Geschichte der Granulozytentransfusion vor 1995 | 7 |
| 3.1.1 Therapeutische Granulozytentransfusion | 7 |
| 3.1.2 Transfusion bei Neugeborenen | 11 |
| 3.1.3 Prophylaktische Transfusion | 12 |
| 3.1.4 Rolle von HLA-Inkompatibilität und granulozytären Antikörpern | 12 |
| 3.2 Entwicklung seit 1995 | 13 |
| 3.2.1 Granulozytentransfusion | 13 |
| 3.2.2 Rolle von HLA-Inkompatibilität und granulozytären Antikörpern | 16 |
| 3.3 Literaturbekannte Funktionsassays für Granulozyten | 17 |
| 3.3.1 Chemotaxis | 17 |
| 3.3.2 Kinetik | 17 |
| 3.3.3 Phagozytose | 17 |
| 3.3.4 Sauerstoffradikalbildung | 18 |
| 3.3.5 Oberflächenantigene | 19 |
| 3.3.6 Mediatorenproduktion | 19 |

| | |
|--|-----------|
| 4. Wissenschaftliche Fragestellung und Zielsetzung der Dissertationsschrift | 19 |
| 4.1 Wissenschaftliche Fragestellung..... | 19 |
| 4.2 Zielsetzung der Dissertationsschrift..... | 22 |
| | |
| II. Material und Methoden | 23 |
| | |
| 1. Studiendesign | 23 |
| 1.1 Patienten und Spender..... | 23 |
| 1.2 Ablauf der Apherese, Transfusion..... | 24 |
| | |
| 2. Material | 25 |
| 2.1 Zellmaterial..... | 25 |
| 2.2 Zellisolierung..... | 26 |
| 2.3 Chemotaxis..... | 26 |
| 2.3.1 Wanderung unter Agarose..... | 26 |
| 2.3.2 Boydenkammer-Assay..... | 26 |
| 2.4 Anzüchtung und FITC-Markierung der Conidien von <i>Aspergillus fumigatus</i> | 27 |
| 2.5 Phagozytose..... | 27 |
| 2.6 Oxidativer Burst..... | 27 |
| 2.7 Oberflächenantigene..... | 28 |
| 2.8 Zytokinmessung..... | 28 |
| 2.9 Stimulus-response-coupling..... | 28 |
| 2.10 Granulozyten-Agglutinationstest..... | 29 |
| 2.11 Granulozyten-Immunfluoreszenz-Test..... | 29 |
| 2.12 PCR zur Typisierung granulozytärer Antigene..... | 30 |
| 2.13 Monoclonal-antibody-specific immobilization of granulocyte antigens..... | 31 |
| 2.14 Geräte..... | 32 |
| 2.15 Medien, Reagenzien etc..... | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 3. Methoden | 34 |
| 3.1 Zellisolierung..... | 34 |
| 3.2 Chemotaxis..... | 35 |
| 3.2.1 Wanderung unter Agarose..... | 35 |
| 3.2.2 Boydenkammer-Assay..... | 36 |
| 3.3 Züchtung und FITC-Markierung von <i>Aspergillus fumigatus</i> Conidien..... | 37 |
| 3.4 Phagozytose..... | 38 |
| 3.5 Oxidativer Burst..... | 42 |
| 3.6 Oberflächenantigene..... | 42 |
| 3.7 Zytokinmessung..... | 45 |
| 3.8 Stimulus-response-coupling..... | 45 |
| 3.9 Granulozyten-Agglutinationstest..... | 45 |
| 3.10 Granulozyten-Immunfluoreszenz-Test..... | 46 |
| 3.11 PCR zur Typisierung granulozytärer Antigene..... | 48 |
| 3.12 Monoclonal-antibody-specific immobilization of granulocyte antigens..... | 50 |
| 3.13 Statistik..... | 52 |
| | |
| III. Ergebnisse | 54 |
| | |
| 1. Granulozytenkonzentrate und klinisches Outcome | 54 |
| 1.1 Granulozytenkonzentrate..... | 54 |
| 1.2 Klinisches Outcome..... | 55 |
| | |
| 2. Anzucht und FITC-Markierung von <i>Aspergillus fumigatus</i> Conidien | 57 |
| | |
| 3. Funktionstest bei Spendern und Konzentraten, einfache Auswertung | 58 |
| 3.1 Chemotaxis..... | 58 |
| 3.2 Phagozytose..... | 60 |
| 3.2.1 Phagozytose FITC-markierter <i>E.coli</i> | 60 |
| 3.2.2 Phagozytose FITC-markierter Conidien von <i>Aspergillus fumigatus</i> | 63 |
| 3.3 Oxidativer Burst..... | 64 |
| 3.3.1 Stimulation mit <i>E.coli</i> | 64 |
| 3.3.2 Stimulation mit f-MLP..... | 66 |
| 3.4 Oberflächenantigene, Aktivierungsmarker..... | 69 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5 Zytokine..... | 71 |
| 3.6 Stimulus-response-coupling..... | 72 |
| 4. Funktionstests bei Empfängern, einfache Auswertung..... | 73 |
| 4.1 Phagozytose..... | 74 |
| 4.1.1 Phagozytose FITC-markierter <i>E.coli</i> | 74 |
| 4.1.2 Phagozytose FITC-markierter Conidien von <i>Aspergillus fumigatus</i> | 75 |
| 4.2 Oxidativer Burst..... | 76 |
| 4.2.1 Stimulation mit <i>E.coli</i> | 76 |
| 4.2.2 Stimulation mit f-MLP..... | 78 |
| 4.3 Oberflächenantigene, Aktivierungsmarker..... | 79 |
| 5. Funktionstests in Spendern und Konzentraten, paarweiser Vergleich..... | 80 |
| 5.1 Chemotaxis..... | 81 |
| 5.1.1 Wanderung unter Agarose..... | 81 |
| 5.1.2 Boydenkammer-Assay..... | 82 |
| 5.2 Phagozytose..... | 84 |
| 5.2.1 Phagozytose FITC-markierter <i>E.coli</i> | 84 |
| 5.2.2 Phagozytose FITC-markierter Conidien von <i>Aspergillus fumigatus</i> | 86 |
| 5.3 Oxidativer Burst..... | 88 |
| 5.3.1 Stimulation mit <i>E.coli</i> | 88 |
| 5.3.2 Stimulation mit f-MLP..... | 90 |
| 5.4 Oberflächenantigene, Aktivierungsmarker..... | 92 |
| 5.5 Zytokine..... | 95 |
| 5.6 Stimulus-response-coupling..... | 96 |
| 6. Funktionstest bei Empfängern, paarweiser Vergleich..... | 97 |
| 6.1 Phagozytose..... | 98 |
| 6.1.1 Phagozytose FITC-markierter <i>E.coli</i> | 98 |
| 6.2 Oxidativer Burst..... | 99 |
| 6.2.1 Stimulation mit <i>E.coli</i> | 99 |
| 6.2.2 Stimulation mit f-MLP..... | 100 |
| 6.3 Oberflächenantigene, Aktivierungsmarker..... | 101 |

| | |
|---|------------|
| 7. PCR, GAT, GIFT und MAIGA | 104 |
| 7.1 PCR zur Typisierung granulozytärer Antigene | 104 |
| 7.2 Granulozyten-Agglutinationstest | 104 |
| 7.3 Granulozyten-Immunfluoreszenz-Test | 105 |
| 7.4 Monoclonal-antibody-specific immobilization of granulocyte antigens | 105 |
| | |
| IV. Diskussion | 106 |
| | |
| 1. Granulozytenkonzentrate und klinisches Outcome | 107 |
| 1.1 Granulozytenkonzentrate | 107 |
| 1.2 Klinisches Outcome | 108 |
| | |
| 2. Funktionstest in Spendern und in Konzentraten | 109 |
| 2.1 Chemotaxis | 109 |
| 2.2 Phagozytose | 111 |
| 2.2.1 Phagozytose FITC-markierter <i>E.coli</i> | 111 |
| 2.2.2 Phagozytose FITC-markierter Conidien von <i>Aspergillus fumigatus</i> | 114 |
| 2.3 Oxidativer Burst | 115 |
| 2.3.1 Stimulation mit <i>E.coli</i> | 115 |
| 2.3.2 Stimulation mit f-MLP | 116 |
| 2.4 Oberflächenantigene, Aktivierungsmarker | 119 |
| 2.5 Zytokine | 121 |
| 2.6 Stimulus-response-coupling | 123 |
| | |
| 3. Funktionstest bei Empfängern | 124 |
| 3.1 Phagozytose | 125 |
| 3.1.1 Phagozytose FITC-markierter <i>E.coli</i> | 125 |
| 3.1.2 Phagozytose FITC-markierter Conidien von <i>Aspergillus fumigatus</i> | 126 |
| 3.2 Oxidativer Burst | 126 |
| 3.2.1 Stimulation mit <i>E.coli</i> | 126 |
| 3.2.2 Stimulation mit f-MLP | 127 |
| 3.3 Oberflächenantigene, Aktivierungsmarker | 128 |

| | |
|--|------------|
| 4. PCR, GAT, GIFT und MAIGA | 129 |
| 4.1 PCR zur Typisierung granulozytärer Antigene..... | 129 |
| 4.2 Granulozyten-Agglutinationstest..... | 130 |
| 4.3 Granulozyten-Immunfluoreszenz-Test..... | 131 |
| 4.4 Monoclonal-antibody-specific immobilization of granulocyte antigens..... | 132 |
| | |
| V. Zusammenfassung | 134 |
| | |
| LITERATURVERZEICHNIS..... | 136 |

Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|-------------------|---|
| ARDS | Adult Respiratory Distress Syndrome |
| β-HCG | human chorionic gonadotropin (menschl. Choriongonadotropin) |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CMV | Cytomegalievirus |
| CRP | C-reaktives Protein |
| d | Tag |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | „enzyme linked immunosorbent-assay“ |
| EKG | Elektrokardiogramm |
| FACS | „fluorescence activated cell scanner“ |
| FCS | fetal calf serum (fötales Kälberserum) |
| FITC | Fluorescein-isothiocyanat |
| f-MLP | Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin |
| GAT | Granulozyten-Agglutinationstest |
| G-CSF, (rhG-CSF) | (recombinant human) granulocyte-colony stimulating factor [(rekombinanter menschlicher) Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor] |
| GIFT | Granulozyten-Immunfluoreszenztest |
| h | Stunde(n) |
| Hb | Hämoglobin |
| HBs-Ag | Hepatitis B-surface-Antigen |
| HBc | Hepatitis B-Core-Antigen |
| HCV | Hepatitis-C-Virus |
| HEPES | Pufferlösung |
| HIV | Human Immunodeficiency Virus |
| HLA | Human Leukocyte Antigen (menschl. Leukozytenantigen) |
| HNA-1, HNA-2 | human neutrophil antigen-1/-2 (menschl. Neutrophilantigen-1/-2) |
| IgG | Immunglobulin G |
| IL-1β; IL-6; IL-8 | Interleukin-1β/-6/-8 |

| | |
|------------------|--|
| INF- γ | Interferon- γ |
| LCT | Lymphotoxizitätstest |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LTB ₄ | Leukotrien B ₄ |
| MAIGA | Monoclonal antibody immobilization of granulocyte antigens |
| NA1; NA2 | neutrophil antigen -1/-2 |
| NADPH | reduziertes Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid |
| NBT | Nitroblau-tetrazolium |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PE | Phycoerythrin |
| PLT | Blutplättchen, Thrombozyten |
| PMA | Phorbol-myristat-acetat |
| PMN | polymorphonukleäre Zellen |
| RPMI 1640 | Zellkulturmedium |
| s | Sekunde(n) |
| SD | Standardabweichung |
| TNF- α | Tumor-Nekrose-Faktor- α |
| TPHA | Treponema pallidum Hämagglutinin |
| TRALI | transfusion related acute lung injury |
| WBC | white blood cells |

I. Einleitung

1. Einführung

Bei immunsupprimierten Patienten mit protrazierter schwerer Neutropenie sind bakterielle Infektionen und Pilzinfektionen mit hoher Morbidität und Mortalität verbunden. Zum Einsatz kommende Antibiotika und Antimykotika sind oft nicht voll wirksam, da die Abräumfunktion der Granulozyten fehlt. In den letzten Jahren konnten einige klinische Erfolge mit der parallelen Transfusion von Granulozytenkonzentraten erzielt werden, wobei die entsprechenden Studien jedoch häufig nicht randomisiert waren. Die eingesetzten Konzentrate waren weder hinreichend charakterisiert noch die Funktionalität der enthaltenen Zellen ausreichend überprüft worden. Mit dem erstmaligen Einsatz von rekombinantem humanem Granulozyten-Koloniestimulierendem Faktor (rhG-CSF¹) wurde in jüngster Zeit die Möglichkeit geschaffen, eine deutlich größere Zahl an Zellen pro Spende zu erzielen. Im Gegensatz zu allen anderen Blutprodukten gibt es jedoch keine detaillierten und verbindlichen Qualitätsanforderungen für Granulozytenkonzentrate. Hier besteht ein dringender Bedarf an wissenschaftlich untermauerten Standards, die im Rahmen dieser Arbeit etabliert werden sollen.

Die Abteilung Transfusionsmedizin ist zusammen mit der Medizinischen Klinik Abt. II und der Kinderklinik Abt. I an der Klinischen Studie „Transfusion von Granulozytenkonzentraten von G-CSF stimulierten Spendern bei immunsupprimierten neutropenischen Patienten mit lebensbedrohlichen Infektionen“ beteiligt, in deren Rahmen diese Dissertation erstellt wurde.

2. Allgemeines

2.1 Granulozyten und ihre Funktion im Immunsystem

2.1.1 Hämatopoetische Abstammung (Janeway et al. 1997; Stahl 1997)

Alle zellulären Bestandteile des Blutes entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Diese Zellen sind pluripotent und bilden zwei Linien von Vorläuferzellen: die lymphatischen Stammzellen, aus denen sich B- und T-Lymphozyten entwickeln, und myeloi-

¹ recombinant *human granulocyte-colony stimulating factor*

de Stammzellen, die Vorläuferzellen von Erythrozyten, Leukozyten und Megakaryozyten (Vorläufer von Thrombozyten) darstellen. Leukozyten lassen sich weiter in Monozyten, basophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und neutrophile Granulozyten differenzieren. Aufgrund ihrer ungewöhnlichen Form werden alle diese Zellen auch als polymorphkernige Zellen bezeichnet. Der Begriff „Granulozyten“ leitet sich vom körnigen Zytoplasma der Zellen ab, das sich im Blutaussstrich charakteristisch anfärben läßt.

Die Reifezeit der Granulozyten beträgt 5-10 Tage, ihre gesamte Lebenszeit etwa 12 Tage. Unter dem Einfluß verschiedener Zytokine (siehe Abschnitt 2.3) entwickeln sich Granulozyten über verschiedene Zellstadien in Interaktion mit dem Knochenmarkstroma zu reifen Zellen. Im Blut beträgt ihre Halbwertszeit nur etwa 8-10 Stunden. Granulozyten befinden sich aber nicht über ihre gesamte Lebenszeit im Blut: Nur etwa 5% der Tagesproduktion befinden sich im peripheren Blut, das entspricht etwa 0,5% des gesamten Körpervorrats. Etwa die Hälfte davon zirkuliert, die andere Hälfte haftet als sogenannter marginaler Pool am Gefäßendothel. Über 90% der reifen Granulozyten verbleiben im Knochenmark, von wo aus sie bei Bedarf (z.B. einer Infektion) rekrutiert werden.

Die zahlenmäßig größte Untergruppe der Granulozyten bilden die neutrophilen Granulozyten, die neben Monozyten/Makrophagen die wichtigsten nicht antigenspezifischen Effektorzellen der Immunantwort darstellen. Diese Neutrophilen waren Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen. Der Begriff „Granulozyten“ wird im Folgenden daher synonym für neutrophile Granulozyten verwendet.

2.1.2 Granulozytäre Funktionen (Janeway et al. 1997; Stahl 1997; Hampton et al. 1998)

Neutrophile Granulozyten verfügen über drei Eigenschaften, die zur Abwehr mikrobieller Infektionen entscheidend sind:

- (a) Fähigkeit zur Chemotaxis
- (b) Fähigkeit zur Phagozytose
- (c) Fähigkeit zur Bakterizidie

Ad (a) Fähigkeit zur Chemotaxis

Granulozyten sind zur Chemotaxis in der Lage, d.h., sie reagieren auf einen chemischen Reiz mit einer gerichteten Wanderung auf diesen Reiz zu, z.B. den Infektionsherd. Als Stimuli fungieren dabei z.B. bakterielle Proteine (N-formyl-leucyl-phenylalanin, f-MLP), aber auch körpereigene Stoffe, wie Leukotrien B₄ (LTB₄), Komplementfaktor C5a oder Interleukin-8

(IL-8). Die Stimulantien („chemoattractants“) binden auf der Oberfläche der Granulozyten an spezifische Rezeptoren, wodurch eine Signalkaskade ausgelöst wird. Über die Aktivierung von G-Proteinen wird Phospholipase C aktiviert. Diese spaltet Phosphatidyl-4,5-Biphosphat (PIP₂) zu Inositoltriphosphat (IT₃) und Diacetylglycerin (DAG). IT₃ und DAG fungieren als „second messenger“, setzen so Calcium frei und aktivieren Proteinkinase C und andere Proteinkinasen. Durch die anschließende Phosphorylierung intrazellulärer Moleküle werden die verschiedenen Funktionen der Neutrophilen initiiert.

Entscheidend für die Leukozytenwanderung ist die vermehrte Expression von Adhäsionsproteinen (z.B. Selektinen und Integrinen) auf der Zelloberfläche, ausgelöst durch die Bindung der chemotaktischen Stimuli an die entsprechenden Oberflächenrezeptoren (siehe auch Punkt 2.2). Über diese Oberflächenmoleküle kann die Zelle ans Endothel binden („Adhärenz“).

Die Wanderung der Leukozyten geht in mehreren Einzelschritten vonstatten: Nach Aktivierung durch den Kontakt mit einem Chemoattractant gehen die Zellen eine lockere Bindung mit dem Gefäßendothel ein. Da diese Bindung reversibel ist, können die Zellen an der Gefäßwand „entlangrollen“ („rolling“). In einem zweiten Schritt gehen die Granulozyten eine festere Bindung mit dem Endothel ein („Adhärenz“). Anschließend fließen die Granulozyten auf der Endotheloberfläche auseinander („spreading“), um danach zwischen den Endothelzellen hindurchzuwandern. Im Gewebe wandern sie zuletzt entlang eines Konzentrationsgradienten von Chemokinen (chemischer Lockstoffe; siehe auch Abschnitt 2.3) zum Infektionsort.

Ad (b) Fähigkeit zur Phagozytose

Sind die Granulozyten ins Gewebe ausgewandert, so erfüllen sie dort ihre entscheidende Funktion: schnelle und effektive Phagozytose von Fremdorganismen und deren intrazelluläre Abtötung.

Phagozytose ist die Aufnahme von Partikeln durch Zellen und schließt deren Bindung an die Zelloberfläche, ihre Aufnahme und ihre Zerstörung ein. Damit der Granulozyt die zu phagozytierenden Keime erkennen und binden kann, werden diese opsonisiert, d.h., die Keime werden mit einem spezifischen Antikörper der ImmunglobulinG-(IgG-)Klasse oder aktiviertem Komplementfaktor C3 beladen. Gleichzeitig exprimiert der Granulozyt spezielle Rezeptoren, um diese Antikörper binden zu können (siehe auch Punkt 2.2).

Haben die Granulozyten einen Erreger erkannt, läuft eine Signalkaskade ab, die der bei der Chemotaxis ähnelt. Der Granulozyt bildet in der Folge Plasmopodien aus, lange Plasmaschläuche, die den Keim umschließen. Der Keim wird so umflossen, bis er sich im Inneren der Zelle in einem Vesikel, dem sogenannten Phagosom, befindet. Das Phagosom verschmilzt

in der Zelle mit Lysosomen. Dabei handelt es sich um Zellorganellen, die verschiedene Verdauungsenzyme (z.B. Proteasen, hydrolytische Enzyme, Lysozyme) enthalten, die die Zellwand der Keime schädigen. Dieser Mechanismus führt zur Abtötung der Krankheitserreger. Unterstützt wird dieser Vorgang durch die Fähigkeit der Granulozyten, reaktive Sauerstoffspezies zu bilden (siehe auch (3) Bakterizidie).

Ad (c) Fähigkeit zur Bakterizidie

Der bei der Phagozytose ins Zellinnere aufgenommene Keim wird zum einen durch die im Phagosom enthaltenen Enzyme geschädigt. Dieser Sauerstoff-unabhängige Mechanismus wird aber entscheidend unterstützt durch die intrazelluläre Bildung von Sauerstoffradikalen („oxidativer Burst“ oder „respiratorischer Burst“). Die NADPH-Oxidase, lokalisiert in der Zellmembran, überträgt freie Elektronen aus dem Pentosephosphatzyklus auf molekularen Sauerstoff, es entsteht das Superoxidion (O_2^-). Dieses dismutiert zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Unter Katalyse der Myeloperoxidase (in den Granula der Neutrophilen) entsteht aus Wasserstoffperoxid und Chlorid-Ionen Hypochlorige Säure (HOCl). Sowohl O_2^- , als auch H_2O_2 und HOCl sind für die meisten Bakterien toxisch.

2.2 Oberflächenantigene (Janeway et al. 1997; Stahl 1997)

Damit Granulozyten die Antikörper-behafteten Keime angreifen und entfernen können, müssen sie in der Lage sein, mit ihren Oberflächenrezeptoren diese gebundenen Antikörper ihrerseits zu binden. Auf der Oberfläche der Neutrophilen finden sich die sogenannten Fc-Rezeptoren. Diese Molekülfamilie, deren Vertreter selbst zur Immunglobulinsuperfamilie gehören, bindet an den Fc-Teil von Immunglobulinen. Verschiedene Fc-Rezeptoren erkennen dabei unterschiedliche Isotypen von Antikörpern. Auf polymorphonukleären Zellen werden $Fc\gamma RII$ (CD32) und $Fc\gamma RIII$ (CD16) konstitutiv exprimiert. CD32 bindet monomeres IgG mit geringer Avidität, IgG-Aggregate aber mit hoher Avidität und liegt in z.Zt. 7 bekannten Isoformen vor. Von CD16 sind zwei Isoformen bekannt, codiert von den Genen $Fc\gamma RIIIA$ und $Fc\gamma RIIIB$. Auch CD16 bindet IgG-Aggregate mit hoher Avidität. Auf Granulozyten finden sich die Isoformen $Fc\gamma RIIa$ und $Fc\gamma RIIb$, wichtig ist hierbei der $Fc\gamma RIIb$ -Polymorphismus NA1/NA2. Der Phänotyp NA1 (neue Nomenklatur : Human Neutrophil Antigen 1a, HNA-1a) tritt dabei in der europäischen Bevölkerung mit einer Häufigkeit von 58%, der Phänotyp NA2 (neue Nomenklatur: HNA-1b) mit einer Häufigkeit von 88% Prozent auf. Weiterhin wichtig

aufgrund seiner weiten Verbreitung ist das Antigen NB1 (neue Nomenklatur: HNA-2a), das bei 97% der Bevölkerung Europas zu finden und auf einem Glukoprotein mit 58 bis 64 kDa lokalisiert ist (alle Angaben mit freundlicher Genehmigung von Herrn PD Dr. J.Bux, Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Gießen). Granulozytäre Antikörper im Patienten können sich gegen alle drei HN-Antigene richten und zu Transfusionsreaktionen führen.

Bei der Leukozytenwanderung spielen aber weitere Oberflächenantigene, sogenannte Adhäsionsmoleküle, eine wichtige Rolle. Zum einen exprimieren Granulozyten Integrine, die mit Zelladhäsionsmolekülen und extrazellulärer Matrix feste Bindungen eingehen. Neutrophile exprimieren alle drei Vertreter der β_2 -Integrine (CD11a/CD18; CD11b/CD18; CD11c/CD18), die eine gemeinsame β -Kette haben.

Zum anderen findet man auf der Oberfläche von Neutrophilen Selektine (CD62), speziell das L-Selektin (CD62L). Die Selektine sind Vertreter einer kleinen Proteinfamilie, die durch Bindung an Kohlenhydrate Wechselwirkungen zwischen Endothel und Leukozyten auslösen.

Während Rolling und Adhäsion als Selektin-vermittelt gelten, wird die festere Anheftung der Granulozyten an das Gefäßendothel den Integrinen zugeschrieben.

2.3. Zytokine (Janeway et al. 1997; Mortsyn et al. 1998; Hollingshead et al. 1991; Erger et al. 1998)

Zytokine sind kleine lösliche Proteine, die, von einer Zelle gebildet, das Verhalten oder die Eigenschaften dieser oder einer anderen Zelle verändern. Es handelt sich um regulatorische Proteine, die nicht nur von Leukozyten, sondern auch von verschiedenen anderen Zellen sekretiert werden und sowohl verschiedene Effekte auf die Immunantwort haben als auch die inflammatorische Antwort modulieren. Ihre Wirkung erstreckt sich dabei gewöhnlich nicht über größere Entfernungen, sondern bleibt autokrin oder parakrin.

Die Wirkungen der Zytokine, die von Makrophagen und Neutrophilen sezerniert werden, dauern meist über einen längeren Zeitraum an. Da sie die Körpertemperatur merklich ansteigen lassen, werden sie auch endogene Pyrogene genannt.

Neutrophile sind in der Lage, IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α zu bilden. Allerdings ist lediglich bei IL-8 bewiesen, daß nach Stimulation der Zellen die Zytokinproduktion meßbar ansteigt (Altstaedt et al. 1998)

IL-1, IL-6 und TNF- α zählen zu den proinflammatorischen Zytokinen, sie sind an der akuten Phase einer Immunreaktion und damit an der Entstehung der typischen Entzündungszeichen (Fieber, Rötung, Schmerz, Wärme, Schwellung) beteiligt. In der Leber regen sie entsprechend die Produktion der akuten Phase Proteine (z.B. C-reaktives Protein) an, im Knochenmark die Mobilisierung von Neutrophilen, erwirken im Hypothalamus die Erhöhung der Körpertemperatur, mobilisieren Proteine aus Fett und Muskulatur, die benötigt werden, um Energie zu gewinnen, und aktivieren B- und T-Lymphozyten. Über die akuten Phase Proteine kann so das Komplementsystem aktiviert und der Keim opsonisiert werden. Neutrophile wandern an den Ort der Entzündung, um dort Keime zu phagozytieren, Fieber und Lymphozyten bekämpfen die Krankheitserreger.

IL-8 ist ein starkes chemotaktisches Zytokin, d.h., es regt Granulozyten zur Wanderung an. Gleichzeitig sind Granulozyten aber auch selbst in der Lage IL-8 zu bilden. IL-8 wird zur Gruppe der Chemokine gezählt, eine Gruppe kleiner Polypeptide, die hauptsächlich als chemische Lockstoffe für phagozytierende Zellen dienen, indem sie Monozyten und neutrophile Granulozyten aus dem Blut zu den Infektionsherden locken. Die Chemokine wandeln zum einen die rollende Interaktion des Leukozyten mit den Endothelzellen in eine stabile Bindung um. Zum anderen dirigieren sie die Zellen entlang eines steigenden Konzentrationsgradienten zum Infektionsherd. Außerdem regt IL-8 die Neutrophilen dazu an, Sauerstoffradikale und Stickstoffoxide zu bilden und den Inhalt ihrer Speichergranula freizusetzen. Damit stimuliert IL-8 die Bakterizidie der Granulozyten. IL-8 wird aber auch mit dem Auftreten allergischer Reaktionen in der Lunge in Verbindung gebracht (Huestis 1982), eine unerwünschte Wirkung, die bei Granulozytentransfusionen beobachtet wurde (Higby et al. 1980).

Der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF) wird ebenfalls zu den Zytokinen gezählt. G-CSF wird endogen von Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen sowie in der Leber und der Milz Neugeborener produziert. Als hämatopoetischer Wachstumsfaktor stimuliert G-CSF selektiv die Granulopoese. Es erhöht die Anzahl der zirkulierenden Zellen über die Bindung an einen spezifischen Rezeptor auf der Zelloberfläche von Neutrophilen, Monozyten und monozytären Vorläuferzellen. Die Proliferierung, Differenzierung und Reifung der Zellen werden angeregt, die Zellen werden funktionell aktiviert. Es kommt zu einer vermehrten Expression von Oberflächenrezeptoren, an die Chemokine binden können. Weiter wird die Chemotaxis erhöht, Phagozytose und mikrobielles Killing werden induziert.

Die Wirkung von G-CSF auf die Zellen gliedert sich also in zwei Wege auf: Zum einen bewirkt G-CSF eine Zytokinese, d.h., Zellen bewegen sich von einem Kompartiment in ein anderes. In diesem Fall wandern Granulozyten aus dem Knochenmarkpool und wahrscheinlich

auch aus dem marginalen Pool in den zirkulierenden Pool ein. Zum anderen stimuliert der Wachstumsfaktor die Granulopoese und die Proliferation neutrophiler Vorläuferzellen.

2.4. Stimulus-response-coupling (Janeway et al. 1997; Lane et al. 1988)

Nach Kontakt mit infektiösen Agentien produziert der Granulozyt neben Sauerstoffradikalen weitere verschiedene Mediatoren, wie zum Beispiel Leukotrien B₄ (LTB₄). Diese locken neue phagozytierende Zellen an den Infektionsort und tragen zu den typischen Veränderungen bei, die man an einem Infektionsort findet. Dieser Vorgang wird speziell im Zusammenhang mit der Produktion von LTB₄ „stimulus response coupling“ genannt, da die Zellen zunächst stimuliert werden („stimulus“) und um andere Zellen anzulocken und selbst agieren zu können als Antwort („response“) diesen Botenstoff generieren. LTB₄ stimuliert die verschiedenen Funktionen der Granulozyten einschließlich der Freisetzung lysosomaler Enzyme, Adhäsion und Aggregation. Damit wird ihm eine wichtige Rolle in der Immunregulation und im Entzündungsgeschehen zugeschrieben.

3. Geschichte der Granulozytentransfusion

3.1 Geschichte der Granulozytentransfusion vor 1995

3.1.1 Therapeutische Granulozytentransfusion

In den Jahren vor 1995 und dabei speziell in den siebziger und achtziger Jahren fanden Granulozytenkonzentrate zunehmend Anwendung bei der Therapie immunsupprimierter Patienten mit schwerer Neutropenie. Diese Patienten erhielten meist eine Hochdosis-Chemotherapie oder eine Knochenmarktransplantation. Die damit verbundene hohe Infektionsrate mit opportunistischen Erregern konnte und kann bis heute mit Antibiotika und Antimykotika nicht ausreichend therapiert und beherrscht werden, da die Abräumfunktion der Granulozyten fehlt. In diesem Zusammenhang wurden in den beginnenden siebziger Jahren erste Studien veröffentlicht, die sich mit der Idee beschäftigen, Granulozyten in Form einer Transfusion an diese Schwerstkranken zu verabreichen, um die fehlenden Abwehrmechanismen zu ersetzen (Tab

1). Dabei flossen Erfahrungen in die Studien ein, die bereits etliche Jahre zuvor in ersten Versuchen mit Granulozyten gesammelt worden waren:

- 1934 Strumia und Mitarbeiter führten erste Versuche mit "leucocyte cream" durch, die sie zur Behandlung der Neutropenie injizierten (Strumia 1934).
- 1953 Brecher et al. verabreichten die erste erfolgreiche Granulozytentransfusion an letal bestrahlte Hunde mit totaler Knochenmarkaplasie (Brecher 1953).
Nach i.v. Applikation der durch Dextrandifferentialsedimentation gewonnenen Granulozyten stellte die Arbeitsgruppe fest, daß etwa 4-5 Stunden lang eine Erhöhung der Granulozytenzahl im Blut festzustellen war, insgesamt aber nur etwa 25% der applizierten Zellen überhaupt im Blut erschienen. Phagozytose und Migration zur Infektionsquelle waren normal.
- 1972 Graw und Mitarbeiter unternahmen die erste randomisierte Studie zur Anwendung von Granulozytentransfusionen (Graw et al. 1972). Im Zuge dieser Studie wurden 39 Patienten mit Granulozyten und Antibiotika sowie 37 Patienten nur mit Antibiotika behandelt (Kontrollgruppe). In der Granulozytengruppe überlebten 46%, während die Überlebensrate in der Kontrollgruppe nur 30% betrug. Weiterhin stellten Graw et al. fest, daß nur die mehrmalige Applikation der Konzentrate (in dieser Studie mindestens viermalig) Erfolg versprach.

In den folgenden Jahren wurden weitere Studien zum selben Thema durchgeführt, die aber nur teilweise erfolgversprechende Ergebnisse lieferten (Tabelle 1). Die Effizienz in drei Studien war gut, in zwei weiteren schlecht. In den effizienten Studien überlebten deutlich mehr transfundierte Patienten als in der Kontrollgruppe ohne Granulozytentransfusion.

Tabelle 1: Kontrollierte Studien zur Neutrophilentransfusion bei Erwachsenen²

| <i>Erstautor</i> | <i>Studienjahr</i> | <i>Patientenzahl</i> | <i>Überlebende Transfusions- gruppe</i> | <i>Überlebende Kontrollgrup- pe</i> | <i>Effizienz</i> |
|------------------|--------------------|----------------------|---|---|------------------|
| Graw (1972) | 1972 | 76 | 46% | 30% | partiell |
| Higby (1975) | 1975 | 36 | 76% | 26% | ja |

² nach Strauss, R.G. (1993) Therapeutic granulocyte transfusions in 1993.

| | | | | | |
|----------------|------|----|-----|-----|----------|
| Fortuny (1975) | 1975 | 39 | 78% | 80% | nein |
| Vogler (1977) | 1977 | 30 | 59% | 15% | ja |
| Alavi (1977) | 1977 | 31 | 80% | 62% | partiell |
| Herzig (1977) | 1977 | 27 | 75% | 36% | ja |
| Winston (1982) | 1982 | 95 | 63% | 72% | nein |

Aus diesen Studien ließen sich detailliertere Schlüsse ziehen :

Vor allem bei Patienten mit persistierender Neutropenie war eine Granulozytentransfusion indiziert. Konnte von einer schnellen Erholung des Knochenmarks ausgegangen werden, so war die Behandlung ausschließlich mit Antibiotika meist ausreichend. Patienten mit Neutropenie und dokumentierter Sepsis zeigten nach Granulozytentransfusion eine erhöhte Überlebensrate. Die bei der Zellseparation erzielten Zellzahlen bewegten sich im Bereich zwischen $0,2$ und $0,8 \times 10^{10}$, nach Stimulation der Spender mit Glucocorticoiden zwischen $1,5$ und $2,5 \times 10^{10}$. Es bestand ein Zusammenhang zwischen der Zahl der applizierten Zellen und dem Grad der therapeutischen Wirksamkeit.

Die aus den Studien abgeleiteten Indikationen sind auch heute noch größtenteils gültig (Menitove et al. 1987):

Granulozytentransfusionen sind indiziert bei neutropenischen Patienten mit einer Granulozytenzahl unter 500 Zellen pro ml, bei bakteriellen Infektionen, v.a. bei Sepsis durch gram-negative Erreger und bei Patienten, die auf die adäquate Behandlung mit Antibiotika nicht ansprechen. Als Indikation gilt außerdem, daß eine Erholung des Knochenmarks innerhalb eines Zeitraumes von 10 Tagen nach Auftreten der Infektion nicht zu erwarten ist.

Die Interpretation der einzelnen Studien stieß jedoch auf einige Probleme, die einen direkten Vergleich der Ergebnisse erschwerten (Huestis 1982; Popovsky 1983):

- Bei der Gewinnung der Zellen bedienten sich die einzelnen Arbeitsgruppen sehr unterschiedlicher Verfahren. In den beiden Studien mit partiellem Erfolg wurden die Zellen beispielsweise durch Filtrationsleukapherese gewonnen, ein Verfahren, das heute nicht mehr angewendet wird, weil die so gewonnenen Granulozyten Defekte aufwiesen (Wright 1984; Strauss 1993; Huestis et al. 1994) und häufiger unerwünschte Nebenwirkungen bei den Empfängern auftraten (Schiffer 1983). Außerdem lassen die zur Anwendung kommenden Verfahren die Gewinnung nur geringer Zellzahlen zu.

- Die Granulozytentransfusion war in keiner Studie die einzige Form der Therapie, so daß stets mit unterschiedlichen Einflußgrößen gerechnet werden mußte.
- Granulozyten agieren vornehmlich im Gewebe, eine Aussage über den Anstieg der Granulozytenzahl im Blut des Patienten erlaubt aus diesem Grund keine klaren Rückschlüsse auf die therapeutische Wirksamkeit. Dennoch bedienten sich einige der Studien dieses Parameters, um eine Aussage über die Effizienz der Transfusionen zu machen (Schiffer 1983).
- Ein weiteres grundsätzliches Problem besteht darin, daß in eine Studie zur therapeutischen Anwendung von Granulozyten entsprechend des Einsatzes der Präparate nur Patienten aufgenommen werden können, die schwerstkrank sind. Daraus ergeben sich aber auch besondere Umstände, die bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten sind, da bei frühzeitigem Einsatz von Granulozytenkonzentraten bessere Ergebnisse zu erwarten sind.
- Die Rolle von Antikörperinkompatibilität und HLA-Unverträglichkeit blieben in den bisherigen Studien ebenfalls ungeklärt (siehe auch Abschnitt unten).
- Die meisten Studien beschränkten ihre Untersuchungen auf gramnegative Keime. Die betroffenen Patienten litten aber auch unter anderen Infektionen. Untersuchungen zur Wirksamkeit der Granulozytentransfusionen in diesem Zusammenhang sind daher notwendig.
- Die Ergebnisse der Studien sind auch deshalb kritisch zu betrachten, weil die Zahl der in eine Studie aufgenommenen Patienten nur gering war. Größere Fallzahlen müssen die Ergebnisse zunächst bestätigen.

Neben der Entwicklung der Granulozytentransfusion haben sich andere Therapieformen stetig weiterentwickelt, z.B. die Antibiotika- und die Chemotherapie. Aus diesem Grund nahm das Interesse an Granulozytentransfusionen in den achtziger Jahren ab, und es wurden nur noch wenige Untersuchungen zu diesem Thema durchgeführt.

Auch die Anwendung bei Pilzinfektionen wurde in den Jahren vor 1995 untersucht, bleibt aber bis heute umstritten (Dutcher 1989): im Tiermodell konnte ein positiver Erfolg nachgewiesen werden, am Menschen ist die Wirkung bisher nicht eindeutig zu belegen (Schiffer 1990). Der Grund hierfür liegt möglicherweise ebenfalls darin, daß bis zu diesem Zeitpunkt nur geringe Granulozytenzahlen gewonnen werden konnten.

3.1.2 Transfusion bei Neugeborenen

Vor allem in den frühen Jahren der Granulozytentransfusion zeigte sich eine deutliche Diskrepanz zwischen den Ergebnissen, die bei der Transfusion Erwachsener einerseits und bei

der Anwendung von Granulozytenkonzentraten im Falle neugeborener Patienten andererseits erzielt wurden.

1 bis 10 von 1000 Neugeborenen entwickeln eine Sepsis, davon sterben 20 bis 75% (Menitove et al. 1987).

Mehrere Untersuchungen zeigten in früheren Jahren gute Erfolge bei der Behandlung septischer Neugeborener mit Granulozytenpräparaten (Christensen et al. 1982; Cairo 1990). Die besonders vielversprechenden Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, daß die Relation zwischen der im Präparat vorliegenden Zellzahl und der Körpergröße im Falle der pädiatrischen Patienten wesentlich günstiger ausfällt als bei den Erwachsenen (Higby et al. 1976). Wird z.B. eine Anzahl an Zellen von $0,2-0,8 \times 10^{10}$, im Falle von Kortikoidstimulation $1,5-2,5 \times 10^{10}$ Zellen gewonnen, so entspricht dies nur etwa dem zirkulierenden Pool an Granulozyten eines Erwachsenen. Der zirkulierende Pool selbst macht aber nur etwa 5% der Tagesproduktion und 0,5% des gesamten Körpervorrats aus (Young 1983). Die Anwendung bei Kindern führt so zu einer viel höheren Dosierung als beim erwachsenen Patienten.

Aus denselben Gründen beobachteten sowohl Higby als auch Christensen und ihre Mitarbeiter, daß Kinder häufig bereits auf eine einzige Transfusion ansprachen, während bei Erwachsenen mehrere Dosen nötig waren (Christensen et al. 1982; Poole et al. 1976).

Diese Resultate zeigen, daß beim therapeutischen Einsatz der Granulozyten stets auf die adäquate Zellzahl zu achten ist (Schiffer 1983).

3.1.3 Prophylaktische Transfusion

In der Zeit vor 1995 beschäftigten sich einige Arbeitsgruppen ebenfalls mit dem prophylaktischen Einsatz der Granulozytenkonzentrate (Clift et al. 1978; Navari et al. 1984).

Obwohl einige der älteren Daten der prophylaktischen Transfusion einen gewissen Nutzen zusprachen und zeigten, daß schweren Infektionen vorgebeugt werden konnten (z.B. bei Knochenmarktransplantierten oder Leukämiepatienten), konnten keine erhöhten Remissions- oder Überlebensraten nachgewiesen werden (Higby et al. 1980; Strauss et al. 1981; Buckner et al. 1983; Navari et al. 1984; Dutcher 1989).

Ferner stieg mit dem Einsatz der Transfusion zur Prophylaxe das Risiko der Alloimmunisierung, was z.B. eine spätere Gabe von Thrombozytenkonzentraten erschwerte (Dutcher 1989; Brach et al. 1992), ebenso wie die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung des Zytomegalievirus (Clift et al. 1984).

Sehr häufig wurde auch über das Auftreten von Nebenwirkungen, wie z.B. Fieber, Zittern, Dyspnoe, pfeifende Atemgeräusche und Lungeninfiltrate, berichtet (Strauss et al. 1981; Menitove et al. 1987).

3.1.4 Rolle von HLA-Inkompatibilität und granulozytären Antikörpern

Mit der Transfusion von Granulozyten werden dem Empfänger Zellen verabreicht, die ein dem Spender eigenes HLA-(humanes Leukozytenantigen-) Muster auf ihrer Oberfläche tragen. Es besteht die Gefahr, daß der Patient Antikörper gegen die für ihn fremden Leukozyten bildet. In der Literatur wurde bereits vor 1995 mehrfach auf das Auftreten von Antikörpern gegen die Granulozyten des Spenders, aber auch auf klinische Probleme nach Infusion von Antikörpern, die mit Blutkonserven zusammen übertragen wurden, hingewiesen (Clift et al. 1984). Leukozytenantikörper wurden für schwere Lungenkomplikationen verantwortlich gemacht und sollten auch eine Rolle bei der Entwicklung von Fieber und mit der Transfusion verbundener Lungenreaktionen (Transfusion-related acute lung injury; TRALI) spielen (Popovsky 1983; Schiffer 1983; Clift et al. 1984). HLA-Inkompatibilität sollte laut einiger Untersuchungen für schlechteres Recovery verantwortlich sein, nicht passende Granulozyten überlebten über einen kürzeren Zeitraum und lösten schwere Nebenwirkungen vor allem bei alloimmunisierten Patienten aus (Huestis 1982; Schiffer 1983). Trotzdem wurde bei den meisten veröffentlichten Studien und Untersuchungen kein HLA-Matching durchgeführt oder auf Granulozytenantikörper getestet. Zum Teil lag dies daran, daß keine einfachen Testmethoden

zu Verfügung standen (Schiffer 1983), zum Teil daran, daß die Spender nach ihrer Verfügbarkeit ausgewählt wurden.

3.2 Entwicklung seit 1995

3.2.1 Granulozytentransfusion

Im Jahre 1993 wurde mit der Einführung von rhG-CSF (rekombinanter humaner Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor; z.B. Neupogen[®], Amgen, Thousand Oaks, CA, USA) als Stimulans, das den Spendern vor der Apherese verabreicht werden kann, eine neue Möglichkeit geschaffen, größere Zellzahlen zu präparieren und somit effektiveren Transfusionen einen Schritt näherzukommen.

Erste Untersuchungen aus dem Jahr 1993 zeigten, daß es möglich ist, durch die Spenderstimulation mit G-CSF auf Zellzahlen zu kommen, die ein Vielfaches von denjenigen betragen, die von unstimulierten Spendern zu erwarten waren (Bensinger et al. 1993; Caspar et al. 1993). Die nun erreichbaren höheren Granulozytenzahlen erleichterten Untersuchungen, die darauf abzielen, die Effektivität des therapeutischen Einsatzes der Konzentrate zu beurteilen, da an den früheren Studien stets die zu geringe Zahl applizierter Zellen kritisiert worden war (Grigg et al. 1995).

1995 folgte dann die erste größer angelegte Studie mit G-CSF, die von Hester und Mitarbeitern durchgeführt wurde (Hester et al. 1995). Sie umfaßte die Apherese an 35 mit G-CSF behandelten Spendern und die Transfusion der so erhaltenen Präparate bei 15 Patienten. Hier wurde festgestellt, daß die Spender innerhalb kurzer Zeit nach der G-CSF-Gabe mit einer Granulozytose reagierten und durchschnittlich $4,1 \pm 2,0 \times 10^{10}$ Zellen gewonnen werden konnten. Die Patienten litten unter Pilzinfektionen und erhielten vor der Granulozytentransfusion zunächst 10 Tage lang Amphotericin B. Es wurden im Durchschnitt 6 (Minimum 3 und Maximum 15) Transfusionen durchgeführt. Die Autoren zeigten auf, daß 9 Patienten auf die Transfusion positiv reagierten, zwei blieben stabil und 6 Patienten zeigten fortschreitende Infektionen, die bei zwei Patienten dieser Gruppe direkt zum Tode führten und bei zwei weiteren zumindest eine Rolle spielten.

Weitere Ergebnisse erhielten Rex et al. (Rex et al. 1995) in ihrer Untersuchung, die ebenfalls aus dem Jahr 1995 stammt. Die Arbeitsgruppe stellte fest, daß die Stimulation der Granulozyten in vitro mit G-CSF und/oder INF- γ ihre Funktion verändern kann. Die Apoptoserate der Zellen verringerte sich nach G-CSF-Behandlung. G-CSF verringerte die Migration im Che-

motaxisassay und ließ die Zellen am Plastikmaterial adhären. PMA-induzierter oxidativer Burst blieb unbeeinflusst.

1996 untersuchten Anderlini et al. (Anderlini et al. 1996) die Toxizität von G-CSF für die Spender. Die häufigsten Nebenwirkungen, über die die Spender berichteten, waren Knochenschmerzen, Kopfschmerzen, Übelkeit, Müdigkeit und lokale Reaktionen. Nahezu alle diese Begleiterscheinungen erwiesen sich aber als mild und vorübergehend. Grigg et al. (Grigg et al. 1996) bestätigten im selben Jahr diese Resultate. Sie empfahlen aber, jeden Spender nur einmal der Apherese-prozedur zu unterwerfen, da der Hämoglobinwert im Blut nach jeder Granulozytenspende deutlich abfiel.

1997 untersuchten Höglund und Mitarbeiter Änderungen der verschiedenen Funktionsparameter, die sich nach in vivo Applikation von G-CSF zeigten (Höglund et al. 1997). Dabei verabreichten sie verschiedene Dosen G-CSF an sechs aufeinanderfolgenden Tagen an gesunde Probanden, Funktionstests wurden an Tag 1, Tag 2 und Tag 5 durchgeführt. Die Versuche umfaßten Tests zu Chemotaxis, Chemilumineszenz, Adhärenz, Phagozytose und zur Bestimmung von Oberflächenantigenen. Die Autoren konnten dabei zeigen, daß die Chemotaxis nach G-CSF-Stimulation am Tag 5 signifikant vermindert war. Chemilumineszenz (Luminol-verstärkt), und Phagozytose wurden ab Tag 2, die Adhärenz ab Tag 5 gesteigert. Die Complement- Rezeptoren CR3 (CD11b/CD18) und CR1 (CD 35) sowie die IgG- Rezeptoren Fc γ RI (CD64) und Fc γ RII (CD32) wurden vermehrt exprimiert. Bei diesen Untersuchungen konnte auch nachgewiesen werden, daß die in-vitro Behandlung der Zellen mit G-CSF z.T. andere Veränderungen hervorruft. So zeigten die Zellen in diesem Fall keine verminderten chemotaktischen Eigenschaften.

1998 folgten einige Untersuchungen der Arbeitsgruppe Dale zu verschiedenen Funktionsparametern von Leukozyten, die mit G-CSF und Dexamethason mobilisiert und per Leukapherese gewonnen wurden (Dale et al. 1998). Sie zeigten, daß das Adhärenzprotein CD11b/CD18 ebenso wie CD14 als LPS-Bindungsprotein in Leukapheresiszellen im Vergleich zu Zellen aus venösem Blut unstimulierter Spender vermehrt und L-Selectin vermindert exprimiert wurden. Auch die Expression von CD32 und CD64 wurde hochreguliert. Zellen aus venösem Blut der vorbehandelten Spender produzierten mehr Sauerstoffradikale, wenn die Zellen in vitro mit TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor alpha) bzw. LPS (Lipopolysaccharid) stimuliert wurden als Zellen der unstimulierten Spender. Auf PMA (Phorbol-myristat-acetat; starker Stimulans des respiratorischen Bursts) reagierten sowohl Zellen aus Leukaphereseprodukten als auch Zellen der stimulierten Spender vermindert. Durch fMLP wurden die Zellen aus venösem Blut nach Stimulation stärker, die Leukapheresezellen schwächer zur Generierung reakti-

ver Sauerstoffspezies angeregt. Die bakteriziden Eigenschaften der Zellen waren aber nicht verändert.

Stroncek et al. (Stroncek et al. 1998) untersuchten im Jahr 1998 verschiedene Antigene auf der Oberfläche der Neutrophilen während täglicher G-CSF-Applikation über 10 Tage. Dazu wurde den Probanden an 10 aufeinanderfolgenden Tagen eine Einzeldosis G-CSF injiziert (5 µg/kg Körpergewicht, s.c.). Blutproben wurden am Tag 0 (vor Studienbeginn) und an den Tagen 2, 4, 6, 10, 11 und 13 entnommen. Am Tag 11 wurde zusätzlich ein Granulozytenkonzentrat per Apherese gewonnen. Die Arbeitsgruppe untersuchte die folgenden Oberflächenmarker: L-Selectin (CD 62L), FcγRIII (CD16), Leucocyte function antigen (CD11a), FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), Aminopeptidase N (CD13), C3bi-Rezeptor (CD11b), β-Integrin (CD18) und NB1 (Neutrophil Specific Antigen). Vor G-CSF-Gabe exprimierten nur wenige Granulozyten FcγRI, während der G-CSF-Gabe dann aber nahezu alle. Das bedeutet, die Granulozyten exprimierten vermehrt den Rezeptor CD64, der mit hoher Affinität IgG bindet. FcγRIII erschien ab Tag 2 in geringerem Maß auf der Oberfläche der Granulozyten. Auch CD11a und CD62L wurden ab Tag 2 nur noch vermindert auf den Neutrophilen exprimiert. Diese Ergebnisse sind besonders deswegen interessant, weil die Hochregulierung einiger dieser Oberflächenmoleküle und die Herunterregulierung von CD62L mit der Aktivierung der Granulozyten in Verbindung gebracht werden (Stroncek et al. 1998). Die Expression von FcγRIII (CD16) auf der Oberfläche der Granulozyten wurde durch die G-CSF-Gabe vermindert. Damit zeigen G-CSF-mobilisierte Granulozyten einen Defizit in zwei wichtigen neutrophilen Antigenen: CD16 und CD62L. Dieses Defizit bedeutet aber nicht automatisch, daß die transfundierten Granulozyten weniger effektiv wirksam sind: Menschen mit einem angeborenen FcγRIII-Defizit zeigten kein erhöhtes Risiko, an Infektionen zu erkranken (Stroncek et al. 1998). CD62L ist zwar wichtig für die Interaktion zwischen Granulozyten und Endothelzellen, es konnte jedoch gezeigt werden, daß G-CSF-mobilisierte Granulozyten in der Lage sind, in einen Entzündungsherd einzuwandern (Stroncek et al. 1998).

3.2.2 Rolle von HLA-Inkompatibilität und granulozytären Antikörpern

Auch in den Jahren nach 1995 beschäftigten sich verschiedene Arbeitsgruppen mit dem Problem der HLA-Inkompatibilität und der Entwicklung granulozytärer Antikörper. Bux et al. konnten 1996 einen Fall beschreiben, der zeigte, daß „Tranfusion-related acute lung injury“ (TRALI, transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz) durch leukozytäre Antikörper im Blut des Patienten ausgelöst werden kann (Bux et al. 1996). Stroncek et al. zeigten im gleichen Jahr in einer retrospektiven Untersuchung, daß bei 11 von 14 untersuchten Patienten, die fiebrige Reaktionen auf Granulozytentransfusionen entwickelt hatten, Antikörper gegen Leukozyten im Serum nachweisbar waren (Stroncek et al. 1996). Sie hielten es für möglich, daß die Granulozyten in den untersuchten Empfängern, deren Serum Antikörper enthielt, sich in der Lunge anreicherten. Da durch die Antikörper die Granulozytentransfusion ineffektiv werden könnte, schlugen Stroncek und Mitarbeiter vor, bei alloimmunisierten Patienten HLA- oder mit den leukozytären Antikörpern kompatible Granulozyten zu verabreichen oder ein Crossmatching durchzuführen.

Damit dies in den Bereich des Möglichen rückte, war die Weiterentwicklung verschiedener Testmethoden für granulozytäre Antikörper nötig. Konnten in früherer Zeit nur Lymphotoxizitätstests (LC) durchgeführt werden, die aber nicht auf granulozytäre Antikörper ansprechen, so war es nun möglich, Granulozytenagglutinationstest (GAT) und Granulozytenimmunfluoreszenztests (GIFT) durchzuführen, die sowohl HLA- als auch granulozytäre Antikörper detektieren können (Stroncek et al. 1996). Mit der Entwicklung des MAIGA-Tests („monoclonal-antibody-specific immobilization of granulocyte antigens“) auf Basis eines Enzym-Immunassays können heute auch spezifisch Antikörper im Serum eines Patienten oder eines Spenders nachgewiesen werden (Bux et al. 1992).

3.3 Literaturbekannte Funktionsassays für Granulozyten

Folgende Funktionstests für Granulozyten sind bekannt:

3.3.1 Chemotaxis

(a) Boydenkammer- Assay (Boyden 1962; Capsoni et al. 1989; Hayashido et al. 1998):

Eine Kammer wird durch einen Filter mit definierter Porengröße in zwei Kompartimente geteilt. Die isolierten Granulozyten wandern durch die Poren hindurch auf einen chemotaktischen Stimulus zu. Anschließend wird die Zahl der gewanderten Zellen auf der Unterseite des Filters oder im unteren Kompartiment bestimmt.

(b) Agarosegeltechnik (Nelson et al. 1988; Michna 1989):

Isolierte Granulozyten wandern in einem Agarosegel auf den chemotaktischen Stimulus zu. Unter dem Mikroskop wird die Wegstrecke der Zellen ermittelt. Im Unterschied zum Boydenkammer-Test wird hier die Wanderstrecke der Zellen bestimmt.

3.3.2 Kinetik (Weiblen et al. 1979)

Mit ^{111}In - (radioaktives Indium-Isotop) markierte Granulozyten werden dem Patienten injiziert, und die Kinetik der Zellen wird durch Messung der Radioaktivität verfolgt. Solche Messungen stellen allerdings eine zusätzliche Belastung für den Patienten dar.

3.3.3 Phagozytose

(a) Phagozytose markierter Bakterien (Stahl et al. 1998):

Radioaktiv markierte und opsonisierte Bakterien werden den isolierten Granulozyten zur Phagozytose angeboten. Die Zellen werden anschließend mit Ultraschall aufgebrochen, um die Bakterien freizusetzen. Aus der Zahl der angebotenen und der Zahl der phagozytierten Bakterien wird die Phagozytoserate bestimmt: Dazu werden die freigesetzten Bakterien ausplattiert und 20 Stunden später die Kolonien gezählt. Diese Methode birgt den Nachteil, daß radioaktive Bakterien verwendet werden müssen, was sie entsprechend aufwendig macht.

(b) Phagotest[®], FACS-Analyse (Miyagawa et al. 1997; Zipfel et al. 1997):

Mittels FITC-(Fluorescein-isothiocyanat; Fluoreszenzfarbstoff) markierter Bakterien wird im Durchflußzytometer die Phagozytoseaktivität der Zellen bestimmt. Diese Methode ist bei entsprechender apparativer Ausrüstung einfach durchzuführen und standardisiert, da ein kom-

merziell erhältliches Testset verwendet werden kann. Ein weiterer Vorteil ist, daß der Test aus Vollblut durchgeführt werden kann, die aufwendige Isolierung der Zellen also entfällt.

(c) NBT- Test (Stahl et al. 1998):

Die isolierten Granulozyten werden mit *Candida*, Serum und NBT (Nitroblau-Tetrazolium) inkubiert. Aus dem Anteil der Zellen mit intrazellulären Candidapartikeln kann die Phagozytoseaktivität und über die Anzahl der Zellen mit Blaufärbung gleichzeitig die Sauerstoffradikalbildung abgelesen werden (Auswertung im Lichtmikroskop), da diese mit dem Farbstoff reagieren. Von Vorteil ist die Möglichkeit, gleichzeitig Sauerstoffradikalbildung und Phagozytose untersuchen zu können.

3.3.4 Sauerstoffradikalbildung

(a) Bursttest[®], FACS- Analyse (Miyagawa et al. 1997):

Die Zellen werden hier mit verschiedenen Stimulantien zur Sauerstoffradikalbildung angeregt, die dann einen zugesetzten Farbstoff oxidieren. Die Auswertung erfolgt durchflußzytometrisch. Auch hier ist wie beim Phagotest ein fertiges Testset verfügbar. Zur Durchführung des Tests wird ebenfalls Vollblut verwendet.

(b) Cytochrom C- Assay (Stahl et al. 1998):

Isolierte Granulozyten, die durch PMA rezeptorunabhängig zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen angeregt wurden, reduzieren Cytochrom C. Die daraus resultierende Extinktionsänderung ist ein Maß für die Menge an gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies.

(c) Myeloperoxidaseaktivität (Zipfel et al. 1997):

Da die Myeloperoxidase an der Bildung der Sauerstoffradikale beteiligt ist, kann die Messung ihrer Aktivität Rückschlüsse auf die Fähigkeit der Zellen zum oxidativen Burst zulassen. Über die Umsetzung von Luminol wird dabei die Chemolumineszenz gemessen. Allerdings wird dabei nur der Schritt der Radikalbildung überprüft, der von der Myeloperoxidase katalysiert wird.

3.3.5 Oberflächenantigene

Nach Inkubation der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern wird durchflußzytometrisch die Expression von Oberflächenmarkern bestimmt. Diese Methode zur Messung von Oberflächenantigenen gehört zu den Standardlabormethoden.

3.3.6 Mediatorenproduktion

Zytokine und Eicosanoide werden mit Standard-ELISA's gemessen. Dabei wird die Produktion teilweise mittels Stimulantien angeregt, zum Teil wird die Konzentration der Mediatoren unstimuliert gemessen.

4. Wissenschaftliche Fragestellung und Zielsetzung der Dissertationsschrift

4.1 Wissenschaftliche Fragestellung

In den vergangenen Jahren konnten einige Erfahrungen mit der Transfusion von Granulozyten gesammelt werden, die deren Nutzen und Erfolg in der Therapie belegen.

Dennoch blieben viele Fragen offen:

Wie lassen sich die Granulozytenkonzentrate charakterisieren?

- Wie sind die Produkte zusammengesetzt?
- Welche Zellen liegen in den Konzentraten vor?

Zunächst wurden die Anteile an eosinophilen, basophilen und neutrophilen Granulozyten bestimmt. Dabei wurde die Zusammensetzung der Präparate mit dem Blutbildautomaten „Cell-Dyne 300“ (Abbot, Wiesbaden, Germany) gemessen.

Ändern sich verschiedene Funktionen der Granulozyten durch die G-CSF-Stimulation der Spender und /oder die Apherese?

- Welchen Einfluß haben G-CSF-Stimulation der Spender und die Apherese auf die Funktion der Zellen?
- Wie verändern sich welche Funktionsparameter der Zelle im Zuge der Verarbeitung?

Die Behandlung der Spender mit G-CSF führt zu einer signifikanten Vermehrung der Zellen, die per Apherese gewonnen werden können. In der Literatur finden sich Belege dafür, daß die Funktion der Zellen ebenfalls verändert wird (Rex et al. 1995). Ob dabei nur positive Effekte angestoßen werden oder auch Mechanismen stimuliert werden, deren Auftreten unerwünscht ist, mußte geklärt werden. So wäre es möglich, daß die Zellen durch die Behandlung mit G-CSF bereits stark aktiviert wurden. Damit hätte man zwar eine größere Zahl an Granulozyten zur Transfusion zur Verfügung, sie wären aber eventuell durch Keime und Entzündungsparameter nicht weiter aktivierbar.

Unter diesem Aspekt wurden verschiedene Funktionstests durchgeführt, die die Funktionalität der Zellen beschreiben sollten. Dabei wurde eingegangen auf

- Chemotaxis
- Phagozytose
- oxidativen Burst
- Expression von Oberflächenmarkern
- Stimulus-Response-Coupling (LTB₄- Produktion)

Die Funktionstests sollten im Spender, vor und nach G-CSF-Gabe, im frischen Präparat direkt nach der Apherese und im Patienten durchgeführt werden. Damit sollten über den gesamten Herstellungs- und Verarbeitungsprozeß alle Veränderungen der Granulozytenfunktionen erfaßt werden.

Zur Bestimmung der Chemotaxis bedienten wir uns der Boydenkammer-Technik und der Agarosegel-Technik (Nelson et al. 1988; Michna 1989).

Zur Messung der Phagozytoseaktivität und zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies dienen die beiden Testkits Phagotest[®] und Bursttest[®] (Orpegen, Heidelberg).

Da die meisten Granulozytenempfänger an Pilzinfektionen litten, sollten zusätzlich anstelle der markierten *E.coli* aus dem Testkit „Phagotest[®]“ FITC-markierte Conidien von *Aspergillus fumigatus* verwendet werden, um die Phagozytoseaktivität der Zellen im Hinblick auf Pilze zu testen. Diese Conidien wurden von uns selbst angezchtet, abgetötet und mit FITC markiert.

Durch Markierung mit fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern sollten verschiedene Oberflächenantigene der Granulozyten detektiert werden, die mit der Aktivierung der Zellen und ihrer Funktion in Zusammenhang stehen. Analysiert werden sollten CD11a, CD16, CD62L und CD64.

Um eine Aussage über die Fähigkeit der Zellen zum stimulus-response-coupling zu ermöglichen, sollte die Menge an LTB₄ bestimmt werden, die von den Zellen als Antwort auf einen bestimmten Reiz gebildet wird (Quantifizierung mittels ELISA).

Alle diese Tests wurden sowohl im Spender (vor G-CSF-Gabe und nach jeder G-CSF- Gabe), nach der Apherese im frischen Präparat und soweit möglich im Empfänger nach der Transfusion durchgeführt.

Wie stark sind die Präparate mit IL-8 kontaminiert?

Da IL-8 mit dem Auftreten von Nebenwirkungen nach Granulozytentransfusion (z.B. allergischen Reaktionen in der Lunge) in Zusammenhang gebracht wird, war die Bestimmung v.a. im Präparat von großer Wichtigkeit. Aber auch im Plasma des Spenders vor G-CSF- und nach jeder G-CSF-Gabe sollte die IL-8-Konzentration gemessen werden. Die Quantifizierung erfolgte mittels Standard-ELISA-Technik.

In welchen Mengen sind proinflammatorische Zytokine im Plasma des Spenders und im Präparat enthalten?

Mit Hilfe der ELISA-Technik sollten die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α bestimmt werden. Diese Zytokine können teilweise von Granulozyten selbst, aber auch von anderen im Präparat enthaltenen Zellen (Monozyten) stammen. Werden sie mit dem Präparat transfundiert, so können sie im Patienten Entzündungsreaktionen auslösen. Daher war ihr Gehalt im Präparat besonders interessant. Um beurteilen zu können, inwieweit G-CSF-Stimulation und/oder Apherese die Zellen zur Zytokin-Produktion anregen, wurden sowohl Plasmaproben des Spenders vor G-CSF- und nach jeder G-CSF-Gabe als auch Überstände der Granulozytenkonzentrate auf ihren Gehalt an Zytokinen hin untersucht.

Welche Rolle spielen die HLA-Inkompatibilität und die Bildung von Granulozytenantikörpern?

Granulozytenkonzentrate werden wegen stets enthaltener Erythrozyten AB0-kompatibel transfundiert. Deswegen wird jeweils eine erythrozytäre Kreuzprobe und ein erythrozytärer Antikörpersuchtest durchgeführt.

Die Patienten wurden außerdem regelmäßig auf HLA-Antikörper untersucht. Es blieb abzuklären, welche Rolle die HLA-Inkompatibilität und die Bildung von Granulozytenantikörpern im Hinblick auf die therapeutischen Wirksamkeit und das Auftreten schwerer Komplikationen spielen.

Diese Frage sollte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Wernet bearbeitet werden. In dieser Arbeitsgruppe wurden die entsprechenden Assays (Agglutinations-Assays, Granulozyten-Antikörper-ELISA auf der Basis des MAIGA) etabliert.

4.2 Zielsetzung der Dissertationsschrift

Da in den letzten Jahren durch neue Schemata in der Chemotherapie die Neutropenie und ihr folgende Infektionen bei Patienten wieder eine häufig auftretende Komplikation geworden waren und die Therapie mit Antibiotika und Antimykotika nicht immer den gewünschten Erfolg zeigte, waren Granulozytentransfusionen wieder in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Durch den Einsatz von rekombinantem humanem Granulozyten-Koloniestimulierenden Faktor (rhG-CSF) war es möglich geworden, größere Mengen an Granulozyten von gesunden Spendern zu gewinnen. Ungeklärt blieb aber weiterhin, wie die Funktionen der Zellen durch die G-CSF-Gabe und/oder die Apherese beeinflusst werden. Ziel dieser Dissertationsschrift war daher, die verschiedenen Funktionen der Granulozyten vor und nach in-vivo-G-CSF-Applikation und im Präparat zu untersuchen, um den Einfluß von G-CSF und der Apherese zu bestimmen. Um die Funktion der Zellen nach ihrer Applikation zu überprüfen, sollten die transfundierten Zellen aus dem Blut der Patienten ebenfalls untersucht werden. Dabei war das Ziel, Qualitätsstandards für die Gewinnung und die Kontrolle der Produkte zu definieren.

II. Material und Methoden

1. Studiendesign

Die Untersuchung der granulozytären Funktionen vor und nach G-CSF-Applikation sowie im Granulozytenkonzentrat war eingebettet in eine klinische Studie. In deren Zusammenhang wurde die Kontrolle und Prophylaxe lebensbedrohlicher Infektionen in der Neutropenie unter zusätzlicher Granulozytentransfusion im Vergleich zur besten derzeit etablierten antibakteriellen und antimykotischen Therapie untersucht.

Das durch die Ethikkommission genehmigte Studienprotokoll lag vor.

1.1 Patienten und Spender

Als Einschlusskriterien für Patienten galten nach Studienprotokoll:

1. Hämatologische Grunderkrankung oder Tumorerkrankung
2. Zustand nach Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation oder konventioneller Chemotherapie und schwere Neutropenie (Granulozyten absolut $< 500/\mu\text{l}$, gesamte Neutropeniedauer mind. 10d, voraussichtlich noch zu erwartende Neutropenie von $> 5\text{d}$ nach Auftreten der infektiösen Komplikationen)
3. Beim therapeutischen Einsatz: Neutropenisches Fieber und Lungeninfiltrat bzw. Weichteilinfektion
4. Beim prophylaktischen Einsatz: Zustand nach invasiver Pilzinfektion in der Vorgeschichte.

Bei Spendern wurden folgende Kriterien der Auswahl zugrunde gelegt:

1. verwandte und persönlich motivierte Spender im Alter zwischen 18 und 65 Jahren
2. Blutgruppenkompatibilität mit dem Empfänger
3. kompatibler CMV-Status (seronegativer Patient erfordert seronegativen Spender)
4. negative Infektionsserologie für HIV, TPHA, Anti-HBc, HbsAg, HCV
5. Normalbefunde für EKG, CRP, Leber- und Retentionsparameter, sowie Blutbild und Differentialblutbild.
6. negativer Schwangerschaftstest bei Frauen im gebärfähigen Alter (β -HCG im Serum).

Als Ausschlußkriterien galten für Patienten:

1. ARDS (adult respiratory distress syndrome)
2. nicht kontrollierbarer Schockzustand.

Für Spender wurden die folgenden Ausschlußkriterien festgelegt:

1. nicht beherrschte Stoffwechselerkrankung, Leber- oder Nierenfunktionsstörung
2. koronare Herzerkrankung bzw. andere Herzerkrankung, die mit einer Einschränkung der links- und /oder rechtsventrikulären Funktion einhergeht
3. Autoimmunerkrankung
4. neurologische Erkrankungen, v.a. Krampfleiden
5. Schwangerschaft und Stillzeit, fehlende zuverlässige Kontrazeption bei Frauen im gebärfähigen Alter
6. gleichzeitige Teilnahme an einer anderen klinischen Studie
7. bekannte maligne Grunderkrankung.

Zur therapeutischen Indikation wurden die Patienten in Therapiearm A (Amphotericin 1 mg/kg Körpergewicht) bzw. in Therapiearm B (Amphotericin 1 mg/kg KG plus Granulozytentransfusion alle zwei Tage) randomisiert. Im Falle der prophylaktischen Indikation erhielten Patienten im Therapiearm A Itraconazol (400 mg/die) und im Therapiearm B Itraconazol (400 mg/die) plus Granulozytentransfusion alle zwei Tage.

Granulozytentransfusionen wurden als zusätzliche Maßnahme zur üblichen antimikrobiellen Therapie und nicht anstatt dieser gegeben.

1.2 Ablauf der Apherese, Transfusion

Nach Aufklärung und Basisuntersuchung erhielt der Spender 8-12 Stunden vor jeder Apherese 5 µg/kg Körpergewicht rhG-CSF (Neupogen[®], Amgen, Thousand Oaks, CA, USA) s.c.. Bei Granulozytenwerten über 50 000/ µl wurde kein weiteres G-CSF injiziert. Die Apherese (kontinuierliche Zentrifugation) erfolgte an der Cobe Spectra (COBE Spectra, Lakewood, CO) und wurde mit Hilfe eines Sedimentationsbeschleunigers durchgeführt. Dazu wurden 500 ml Hydroxyethylstärke (HES, 450/0,7: Molekulargewicht 450, Substitutionsgrad 70%) verwendet, als Antikoagulans diente Tri-Natrium-Citrat (46,7%ige Lösung, 30 ml pro 500 ml

wendet, als Antikoagulans diente Tri-Natrium-Citrat (46,7%ige Lösung, 30 ml pro 500 ml HES). Insgesamt wurden 4-6 Liter Blut separiert. Erhalten wurden etwa 300 ml Granulozytenkonzentrat. Spender durften sich maximal 4 Apheresen pro Jahr unterziehen. Wurden mehrere Apheresen an einem Spender durchgeführt, so erfolgten diese jeden zweiten Tag. Der Spender wurde vor jeder Apherese erneut mit Neupogen® behandelt.

Die Zytapherese verlief modifiziert nach dem WBC/PMN (White Blood Cell/ Polymorphonuclear Cell)- Protokoll der Cobe Spectra. Die Apherese in unserem Zentrum orientierte sich dabei nur an den Basiseinstellungen, die empirisch durch visuelle Überwachung der Separationskammer und durch Vergleich mit der Farbskalakarte (Colorgram der Fa. Cobe) optimiert wurden. Das praktische Vorgehen entsprach der vorliegenden Standard-Arbeitsanleitung für Granulozytapherese der Abteilung Transfusionsmedizin/ Uniklinikum Tübingen.

Vor Transfusion wurden die Granulozytenpräparate mit 30 Gy bestrahlt, die Transfusion mußte so schnell als möglich erfolgen, spätestens jedoch 6 Stunden nach Aphereseende. Die Infusionsgeschwindigkeit durfte dabei 10 ml/kg Körpergewicht/h nicht überschreiten. Laborchemische Überwachung sowie ein Mindestabstand von 10 Stunden vor und nach Amphotericin-Behandlung waren einzuhalten.

Nach Anstieg der Granulozytenzahl auf $> 1000/\mu\text{l}$ 24 Stunden nach Granulozytengabe wurden keine weiteren Transfusionen durchgeführt.

2. Material

2.1 Zellmaterial

Zur Untersuchung der Granulozyten wurden Spendern vor (Voruntersuchung) und nach G-CSF-Gabe (8-12 Stunden nach Neupogen®-Gabe, unmittelbar vor Apherese) jeweils ca. 27 ml Vollblut in sterilen Monovetten (Sarstedt) entnommen. Dabei wurden zwei Monovetten mit EDTA (insgesamt 18 ml) und eine Monovette mit Heparin (9 ml) als Antikoagulans verwendet.

Den Patienten wurden zur Funktionstestung der applizierten Granulozyten 8 Stunden nach Transfusion 5,5 ml Vollblut abgenommen (Antikoagulans: Heparin).

Proben aus Granulozytenkonzentraten (ca. 2 ml) wurden unmittelbar nach Beendigung der Apherese unter sterilen Bedingungen entnommen.

2.2 Zellisolierung

- Polymorphprep[®] (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norwegen): Na-Diazoat (13,8 % M/V), Dextran 500 (8,0% M/V), Dichte: 1.113 +/- 0,001 g/ml, Osmolalität: 460 +/- 15 mOsm
- Isotonische Kochsalzlösung (0,9 %; Delta Pharma, Pfullingen)
- Kochsalzlösung 0,45 %
- Ammoniumchlorid-Lysepuffer (Universitätsapotheke, Uniklinikum Tübingen; s. Medien, Reagenzien etc.)
- Medium (s. Medien, Reagenzien etc.)
- 14 ml Polystyrol-Röhrchen (Falcon, Becton Dickinson Labware Europe, Meylan Cedex, Frankreich)
- Pasteurpipetten (Glas)

2.3 Chemotaxis

2.3.1 Wanderung unter Agarose

- Agarose low EEO (-mr)0,1-0,15 (Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg)
- Gelatine (Sigma, München)
- f-MLP-Lösung (Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin; 5mM in Ethanol; f-MLP: Sigma, München; Ethanol: Merck, Darmstadt)
- 2 x RPMI 1640 Medium (Eigenherstellung, s. Medien, Reagenzien etc.)
- Chamberslides (Merck Labor und Vertrieb GmbH, Essen)
- Kamm zum Einarbeiten der Wells in die Gele (Eigenanfertigung der Werkstatt)

2.3.2 Boydenkammer-Assay

- Filterwaschlösung (Eigenherstellung, s. Medien , Reagenzien etc.)
- Filterpuffer (Eigenherstellung, s. Medien, Reagenzien etc.)
- Natriumacetat-Puffer (Eigenherstellung, s. Medien, Reagenzien etc.)
- fMLP-Lösung (5mM in Ethanol) (fMLP: Sigma, München; Ethanol: Merck KG, Darmstadt)
- Triton X 100 (Merck KG, Darmstadt)
- 4-Nitrophenyl- β -D-glucuronid, reinst (Serva Electrophoresis GmbH, Frankfurt/Main)
- Glycin Puffer (Eigenherstellung; Glycin: Merck, Darmstadt)
- PBS (Gibco/ Life Technologies, Paisley, Schottland, supplementiert (s. Medien, Reagenzien etc.)

- Transwell[®] Filtereinsätze (Corning Costar, Corning Inc. , NY, USA)
- Mikrotiterplatten, Flachboden, Polystyrol (Corning Glass Works, Corning, NY, USA)

2.4 Anzuchtung und FITC-Markierung der Conidien von *Aspergillus fumigatus*

- *Aspergillus fumigatus* (Fresenius Stammkeim ATCC 9197, NRRL 1979; DSM Nr. 819)
- PKH2 Green Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma, München)
- Sabourrand-Glucose-Bouillon
- Sabourrand-Glucose-Schrägagar
- Aqua dest. mit 0.2% Tween 80
- Natriumphosphat-Puffer (10mM, Universitätsapotheke, Uniklinikum Tübingen)
- Ringerlösung, pH 6 (Universitätsapotheke, Uniklinikum Tübingen)
- Sterilfilter, Glasfilter
- Neubauer Zählkammer

2.5 Phagozytose

- Phagotest[®] Testkit (Orpegen Pharma GmbH, Heidelberg)
- FITC-markierte Conidien von *Aspergillus fumigatus* (ATCC 9197, NRRL 1979; DSM Nr. 819)

2.6 Oxidativer Burst

- Bursttest[®] Testkit (Orpegen Pharma GmbH, Heidelberg)

2.7 Oberflächenantigene

Folgende markierte monoklonale Antikörper gegen Oberflächenantigene auf Granulozyten wurden verwendet (Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich):

- CD14-PE
- CD16-FITC
- CD11a-FITC
- CD62L-FITC
- CD64-FITC
- IgG1-FITC/ IgG2a-PE (Isotypkontrolle)

Weiterhin wurde verwendet:

- OptiLyse[®]C Lysing Solution , Lysepuffer für Erythrozyten (Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich)
- PBS (Gibco/ Life Technologies, Paisley, Schottland)

2.8 Zytokinmessung:

Folgende ELISA-Testkits der Firma R&D Systems, Minneapolis, USA wurden verwendet:

- Quantikine human IL-1 β Immunoassay
- Quantikine human IL-6 Immunoassay
- Quantikine human IL-8 Immunoassay
- Quantikine human TNF- α Immunoassay

2.9 Stimulus-response-coupling (LTB₄-Produktion)

- Medium (s. Medien, Reagenzien etc.)
- Calciumchloridlösung, 10mM in 0.8% Kochsalzlösung (Universitätsapotheke, Uniklinikum Tübingen)
- Calcium-Ionophore A23187 (Sigma, München), 1mg/ml in DMSO (Merck KG, Darmstadt)
- LTB₄ Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, USA)

2.10 Granulozyten-Agglutinationstest (GAT):

- Serum des Granulozytenempfängers
- Isolierte Granulozyten des Spenders (5000 Zellen/ μ l in PBS)
- Positiv-Kontrolle: Serum eines Spenders mit α 5B-Antikörper (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn PD Dr. J. Bux, Transfusionsmedizin der Uniklinik Gießen)
- Negativ-Kontrolle: AB-Serum
- Geölte Terasaki-Platten

2.11 Granulozyten-Immunfluoreszenz-Test (GIFT):

- Serum des Granulozytenempfängers
- Isolierte Granulozyten des Spenders (5000 Zellen/ μ l in PBS), fixiert mit Cellfix® (Becton Dickinson, Erembodegem, Belgien)
- Antikörper: Anti-IgG-FITC (F(ab')₂ Fragment von Kaninchen-Anti-Mensch-IgG, spezifisch für Gamma-Ketten; FITC-konjugiert) (DAKO, Glostrup, Dänemark)
Anti-IgG-FITC (gleiches Fragment, aber Kaninchen-Anti-Maus; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. E. Fehrenbach, Transfusionsmedizin der Uniklinik Tübingen)
0,2 mg/ml
- Positiv-Kontrolle: Monoklonaler Antikörper CD16 (Fc γ RIII-Rezeptor; Klon 3G8, Isotyp IgG1-Maus gegen menschliche Neutrophile) (Coulter-Immunotech, Marseille, Frankreich); 0,01 μ g/ml
- Negativ Kontrolle: AB-Serum
- PBS (Gibco/ Life Technologies, Paisley, Schottland)
- ELISA-Rundbodenplatten (96-Well) (Corning Glass Works, Corning, NY, USA)

2.12 PCR zur Typisierung granulozytärer Antigene:

- Primer: *HGHI* (Vorwärtsprimer für Human Growth Hormon)
Sequenz: 5'-CAGTGCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3'
(Einsatz in Endkonzentration 1,25 pmol/μl)
HGH II (Rückwärtsprimer für Human Growth Hormon)
Sequenz: 5'-ATCCAATCACGGATTTCTGTTGTGTTTC-3'
(Einsatz in Endkonzentration 1,25 pmol/μl)
SSP5-NA1 (Vorwärtsprimer für Human Neutrophil Antigen-1a)
Sequenz: 5'-CAGTGGTTTCACAATGTGAA-3'
(Einsatz in Endkonzentration 5 pmol/μl)
SSP1-NA2 (Vorwärtsprimer für Human Neutrophil Antigen-1b)
Sequenz: 5'-CAATGGTACAGCGTGCTT-3'
(Einsatz in Endkonzentration 5 pmol/μl)
SSP3 (Rückwärtsprimer für Human Neutrophil Antigen-1a und -1b)
Sequenz: 5'-ATGGACTTCTAGCTGCAC-3'
(Einsatz in Endkonzentration 5 pmol/μl)
(alle: MWG-Biotech AG, Ebersberg)
- JumpStart REDTaqReady Mix PCR Reaction Mix (enthält JumpStart REDTaq genomic DNA Polymerase [0,06 E/μl], 99% reine Deoxynukleotide [0,4 mM], Reaktionspuffer, Antikörper TaqStart), (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA)
- Agarose low EEO (-mr)0,1-0,15 (Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg)
- TAE-Puffer 500ml 50fach Konzentrat:
121,14g TRIS [Tris[hydroxymethyl]aminomethan; (Sigma Chemical, Saint Louis, Missouri, USA),
9,3g EDTA (Merck KG, Darmstadt)]
mit Eisessig (Merck KG, Darmstadt) auf pH 7,5 einstellen
- DNA Molecular Weight Marker VI (154-2176 BP, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Ethidiumbromid (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA)

2.13 Monoclonal-antibody-specific immobilization of granulocyte antigens (MAIGA-Assay):

- Coating Puffer 0,3975 g Na₂CO₃ (Merck KG, Darmstadt)
 0,7325 g NaHCO₃ (Merck KG, Darmstadt)
 0,05 g NaN₃ (Merck KG, Darmstadt)
 Aqua dest.ad 250 ml
 pH mit HCl oder NaOH auf 9,6 eingestellt
- PBS/0,2% FCS (Gibco/ Life Technologies, Paisley, Schottland)
- PBS/2% FCS (Gibco/ Life Technologies, Paisley, Schottland)
- PBS/0,05% Tween 20 (Gibco/ Life Technologies, Paisley, Schottland)
- Lyse-Puffer 2,4 g TRIS
 8,76 g NaCl
 9,5 ml Triton-X-100
 1,86 g EDTA (alle Merck KG, Darmstadt)
 Aqua dest. ad 1000 ml
- Lyse-Puffer mit Proteinase-Inhibitoren:
 950 µl Lyse-Puffer
 20 µl PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid; 0,1M in Isopropanol)
 20 µl Aprotinin (Originallösung)
 20 µl Leupeptin (Originallösung)
 pH 7,4
 (alle Sigma, Saint Louis, Missouri, USA)
- MAINA-Waschpuffer:
 1,21g TRIS in 1000 ml Aqua dest.
 + 9,5 ml Triton-X-100
 + 4,5 ml Tween 20
 + 72,5 mg CaCl₂ x 2H₂O
 pH 7,4
 (alle Merck KG, Darmstadt)
- Ziege-Anti-Mensch-IgG:
 3 µg/ml in Coating-Puffer (Dianova, Hamburg)

- Monoklonale Antikörper:

3G8 (CD16; Maus-Anti-Human-IgG; Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich; 0,2 mg/ml)

7D8 (NB1; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Bux, Transusionsmedizin der Uniklinik Gießen)

- Peroxidase-konjugierter Ziege-Anti-Mensch-IgG:

Fc γ Fragment spezifisch (0,8 mg/ ml; Dianova, Hamburg)

- OPD-Tabletten 3,5 mg 1,2-Phenyldiamin-dihydrochlorid pro Tablette (entspricht 2 mg 1,2-phenyldiamin); Substrat für Peroxidase zur Verwendung im ELISA (DAKO; Glostrup, Dänemark)

- Wasserstoffperoxid 30 % (Merck KG, Darmstadt)

- Schwefelsäure 4N (Merck KG, Darmstadt)

2.14 Geräte:

- Analysenwaage AS 200 (Ohaus/Sartorius)

- Brutschrank Steri-Cult 200 (Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA)

- Cell Dyne Hemozytometer, Blutbildautomat (Abbott, Illinois, USA)

- Durchflußzytometer Epics XL/ MCL (Beckmann Coulter, Krefeld):

Argonionenlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm; FITC-Wellenlängenbereich 515 bis 545 nm, PE-Wellenlängenbereich 565 bis 610 nm; Trägerflüssigkeit Isoton II[®] (Beckmann/Coulter, Krefeld); verwendet wurde die Station in Verbindung mit der entsprechenden System II[®] Software (ebenfalls Beckmann Coulter, Krefeld).

- Electrophoresis Power Supply (Gibco BRL)

- GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer, Norwalk, USA)

- Horizon 11-14 Horizontal Gel Electrophoresis System, Elektrophorese-Kammer (Life Technologies, Saithersburg, MD, USA)

- Laminar-Flow Werkbank (Clean-Air, Haan)

- Mikroskop Axioskop (Zeiss)

- Okularmikrometer (Zeiss)

- pH-Meter pH 540 GLP (WTW, Weilheim)

- Photometer EAR 340 ATTC (Tecan GmbH, Crailsheim/ SLT Labinstrument, Grödy, Österreich)
- Präzisionswaage HF 4000 (AND/ Sartorius)
- Washer Columbus für ELISA-/ Mikrotiterplatten (Tecan GmbH, Crailsheim)
- Wasserbad Typ 1008 (GFL mbH, Burgwedel)
- Zentrifuge EBA 12R (A. Hettich GmbH und Co KG, Tuttlingen)
- Zentrifuge Rotina 46R (A. Hettich GmbH und Co. KG, Tuttlingen)
- Zentrifuge Varifuge RF (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)

2.15 Medien, Reagenzien etc.:

- | | |
|--------------------------------------|--|
| 1 x RPMI 1640 (Biochrom KG, Berlin): | <ul style="list-style-type: none"> - supplementiert mit 10% FCS Roticult (Carl Roth GmbH u. Co., Karlsruhe) - HEPES-gepuffert (2 %) (Biochrom KG, Berlin) |
| 2 x RPMI 1640 (Biochrom KG, Berlin): | <ul style="list-style-type: none"> - 10 ml 10 x RPMI 1640 (Biochrom KG, Berlin) - 1 ml HEPES-Puffer (Biochrom KG, Berlin), pH 8,1 - 39 ml Aqua bidest. (Delta Pharma, Pfullingen) |
| PBS, supplementiert: | <ul style="list-style-type: none"> - PBS (Gibco/ Life Technologies, Paisley, Schottland) - 10% FCS - pro 10 ml PBS 100 µl Ca/Mg-Stammlösung (s.u.) |
| Ammoniumchlorid-Lysepuffer: | <ul style="list-style-type: none"> - 1000ml Lösung enthalten: - 8,2900g Ammoniumchlorid z.A. - 1,0000g Kaliumhydrogencarbonat z.A. - 0,0368g Komplexon III z.A. - sterilfiltriert, pH 7,6 |
| Filterwaschlösung: | <ul style="list-style-type: none"> - 20g NaOH-Plätzchen (Merck KG, Darmstadt) - 250 ml Aqua dest. - 250 ml Ethanol (96%; Merck KG, Darmstadt) |

- Filterpuffer:
- 7,12g Di-Natriumhydrogenphosphat
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; Merck KG, Darmstadt)
 - 400 ml Aqua dest.
 - mit Salzsäure (HCl rauchend 37%; Merck KG, Darmstadt) auf pH 7 eingestellt.
- Natriumacetat-/Essigsäurepuffer:
- 300 ml Essigsäure (0,1M; 6 ml konz. Essigsäure, [Merck KG, Darmstadt] auf 1000 ml Aqua dest.)
 - mit 0,1M Natriumacetatpuffer (13.6g Na-Acetat $\times 3\text{H}_2\text{O}$ [Merck KG, Darmstadt] auf 1 Liter Pufferlösung) auf pH 4 eingestellt
- Glycinpuffer:
- 15g Glycin (Sigma, München)
 - 30 Stck. NaOH-Plätzchen (Merck KG, Darmstadt)
 - ad 500 ml Aqua dest.
- Ca/Mg-Stammlösung:
- 1,324g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck KG, Darmstadt)
 - 1g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (Merck KG, Darmstadt)
 - auf 100 ml Aqua dest.

3. Methoden

3.1 Zellisolierung:

Zur Gewinnung von Granulozyten wurden den Spendern vor Neupogen[®]-Applikation und nach jeder Neupogen[®]-Applikation (dies entsprach dem Zeitpunkt unmittelbar vor Apherese) 18 ml EDTA-Blut in sterilen Monovetten (Sarstedt) entnommen. Granulozyten wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert. Dazu wurden 5 ml Polymorphprep[®] mit 5 ml Vollblut in 14 ml Polystyrol-Röhrchen überschichtet und bei 450 x g und 22°C 35 Minuten lang ohne Bremse zentrifugiert. Die Granulozyten formten eine exakt abgegrenzte Bande (PMN-Fraktion) im Dichtegradienten, die nach der Zentrifugation mittels Pasteurpipette gewonnen wurde. Die PMN-Fraktion wurde anschließend mit 0,45%iger Kochsalzlösung 1:2 verdünnt, um normale osmotische Verhältnisse wiederherzustellen. Nach einem zweiten

Zentrifugationsschritt (400 x g, Raumtemperatur, 10 Min.), wurden die Zellen in 1 ml isotonischer Kochsalzlösung resuspendiert und mit 9 ml Ammoniumchlorid-Lysepuffer versetzt. Zur Lyse vorhandener Resterythrozyten wurde diese Suspension 15 Min. im Dunkeln auf Eis gelagert und danach erneut abzentrifugiert (400 x g, 4°C, 10 Min.). Nach einem letzten Waschschrift mit isotonischer Kochsalzlösung konnten die Zellen in Medium (RPMI 1640 mit 10% FCS) oder supplementiertem PBS (für Boydenkammer-Assay; siehe dort) wiederaufgenommen werden.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte im Cell-Dyne[®] Blutbildautomaten (Abbot, Wiesbaden, Germany).

3.2 Chemotaxis:

Um die Fähigkeit der Zellen, auf einen Stimulus zuzuwandern zu messen, wurden zwei Methoden angewandt. Im Falle der Agarosegele wurde die Wanderstrecke der Granulozyten, im Falle des Boydenkammer-Assays die Anzahl der gewanderten Zellen bestimmt. Damit konnte zum einen bestimmt werden, ob die Wanderstrecke unabhängig von der Zahl der wandernden Granulozyten (Agarosegeleassay) und/ oder die Zahl der wandernden Zellen beeinflusst wurden.

3.2.1 Wanderung unter Agarose

Die Wanderung unter Agarose wurde wie bereits an anderer Stelle (Nelson et al. 1975; Nelson et al. 1988; Michna 1989) beschrieben, aber mit einigen Modifikationen durchgeführt.

Agarosegele wurden mittels zweier separat angesetzter Lösungen hergestellt: 0,25 g Agarose wurden in 12,5 ml destilliertem Wasser im kochenden Wasserbad gelöst und in ein 56°C Wasserbad überführt. 0,125g Gelatine-Pulver wurden in 12,5 ml 2fach RPMI 1640 bei 56°C gelöst. Beide Lösungen wurden bei 56°C gemischt.

Chambersslides, Glas-Objektträger, die mittels Kunststoffaufsatz in zwei Kammern unterteilt werden, wurden mit Gelatine (2 % in Aqua bidest.) beschichtet. Anschließend konnte jede Kammer mit 2,5 ml Agarosegellösung befüllt werden. Zur Einarbeitung von je zwei Wells in jede der Kammern wurde vor Erhärten der Gele ein Kamm (Eigenanfertigung) eingesetzt. Die Gele härteten im Kühlschrank bei 4°C aus und waren dort bis zu 5 Tage haltbar.

Zur Messung der Chemotaxis wurden jeweils 30 µl Zellsuspension (mindestens 100 000 Granulozyten in Medium) in ein Well jeder Kammer pipettiert. Zur Erfassung der Spontanmigra-

tion wurden in das zweite Well in Kammer 1 20 µl Medium, zur Messung der induzierten Migration in Kammer 2 20 µl fMLP-Lösung (500 nM in Medium) pipettiert. Die abgedeckten Gele blieben zur Inkubation 2 Stunden im Brutschrank (90% relative Feuchte, 5% CO₂, 37°C). Die Zellen wurden anschließend über Nacht bei 4°C in Glutaraldehyd-Lösung (2,5% in PBS) fixiert und nach Pappenheim (May-Grünwald/ Giemsa-Lösung) angefärbt. Die gewanderte Strecke konnte unter dem Mikroskop (Vergrößerung 20fach) mit Hilfe eines Okularmikrometers ausgemessen werden.

Die im den Ergebnisteil genannten Werte zeigen die reine chemotaktische Wanderstrecke, d.h., die Spontanmigration wurde bereits von der induzierten Migration subtrahiert.

3.2.2 Boydenkammer-Assay- Wanderung durch Filterporen

Die Wanderung der Granulozyten durch Filterporen („Boyden-Kammer-Assay“) wurde modifiziert nach bereits beschriebenen Verfahren (Boyden 1962; Capsoni et al. 1989; Partsch et al. 1989; Mrowietz et al. 1995; Tascini et al. 1996) durchgeführt (Schröder 1997).

Die isolierten Granulozyten wanderten in diesem Versuch durch die Poren (3µm) einer Polycarbonat-Membran in das untere Kompartiment einer Kammer. Die Kammer wurde gebildet aus einer 24 Well Kulturplatte, die durch den Membraneinsatz in zwei Kompartimente unterteilt wurde. Um zu verhindern, daß die Zellen nach dem Durchwandern der Poren an der Unterseite der Membran adhären, wurden die Filter vorbehandelt. Dazu wurden diese 30 Minuten in ethanolische Natronlauge („Filterwaschlösung“) gewaschen und anschließend 10 Minuten in Filterpuffer eingelegt. Nach dem Trocknen der Filter konnten diese in die Kammer eingesetzt werden. In das untere Kompartiment wurden zur Messung der Spontanmigration 200 µl supplementierte PBS-Lösung, zur Untersuchung der induzierten Migration 200 µl fMLP-Lösung (10^{-7} M in supplementierter PBS-Lösung) eingefüllt. Auf die Filter wurden 100µl Zellsuspension (200 000 Zellen/ 100 µl) aufgetragen. Nach einer Stunde Inkubationszeit (90% relative Feuchte, 5 % CO₂, 37°C) konnten die Filter entfernt werden, jeweils 100 µl aus jeder Kammer wurden in eine Mikrotiterplatte überführt (Doppelwerte). Als Standard dienten (nicht gewanderte) Zellen desselben Probadens, wobei 100 000, 50 000 und 10 000 Granulozyten direkt in die Mikrotiterplatte überführt wurden. Die Zellen wurden mittels Triton X 100 lysiert, dabei kam es zur Freisetzung von β-Glucuronidase. Nach Hinzufügen von 4-Nitrophenyl-β-D-glucuronid als Substrat der β-Glucuronidase mußte der Ansatz erneut über Nacht inkubieren (identische Bedingungen). Am nächsten Tag wurde die Reaktion mittels Glycin-Puffer gestoppt, der Substratumsatz wurde bei 405 nm im Photometer bestimmt. Auch

hier wurden die Ergebnisse durch Subtraktion der Spontanmigration von der induzierten Migration erhalten.

3.3 Züchtung und FITC-Markierung von *Aspergillus fumigatus* Conidien (Nessa et al. 1997)

Der Stammkeim wurde in Sabouraud-Glucose-Bouillon (SGB) gelöst, und 5 Röhrrchen Sabouraud-Glucose-Schrägagar wurden mit je 0,5 ml Pilzsuspension beimpft. Nach 7 Tagen Bebrütung (30°C) wurden die Röhrrchen mit jeweils 5 ml SGB überschichtet und die Oberfläche mittels Impföse abgeerntet. Die Suspension wurde abpipettiert und in Röhrrchen 2 überführt, danach wurde wie mit Röhrrchen 1 verfahren usw. Nach dem Abschwemmen aller 5 Röhrrchen wurde die Suspension in ein steriles Röhrrchen überführt und auf ein Volumen von 5 ml aufgefüllt. Je 1 ml Suspension wurden dann auf 5 SG-Agarplatten aufgegeben. Nach dem Antrocknen wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und 7 Tage bei 30°C bebrütet. Nach 7 Tagen wurde jede Platte mit 5 ml Aqua dest. (enth. 0,02% Tween 80) überschichtet. Mittels Glasspatel wurde die Oberfläche abgespatelt, der Überstand mit einer sterilen Pipette abgesaugt und in einem sterilen Röhrrchen aufgefangen. Nach Zugabe von sterilen Glasperlen wurde die Suspension mittels Vortex gut homogenisiert und über 20 Min. bei 80°C inaktiviert. Zur Filtration der Suspension wurde über den Sterilfilter (Porengröße 0,2µm) ein steriler Glasfaserfilter (Vorfilter für Pilzfäden) gelegt, die Suspension filtriert und mit 0,02% Tween 80 in Aqua dest. nachgespült. Der Vorfilter wurde verworfen, der Sterilfilter in einem 50 ml Röhrrchen mit 15 ml Natriumphosphat-Puffer (10mM, Universitätsapotheke) 60 s mittels Vortex ausgeschüttelt, der Filter anschließend verworfen. Die Suspension wurde zweimal in Natriumphosphat-Puffer gewaschen und der Überstand abpipettiert. Die Suspension wurde dann in 5 ml Ringer-Lösung (pH 6, Universitätsapotheke) resuspendiert und die Conidienzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Zur Markierung der Conidien diente der PKH2 Green Fluorescent Cell Linker Kit der Firma Sigma: Die Conidiensuspension wurde dazu 5 Min bei 400 x g abzentrifugiert und der Überstand möglichst vollständig abpipettiert. Im Restvolumen wurden die Conidien anschließend resuspendiert und mit 1 ml Diluent A versetzt. 1 ml PKH2 Farbstoff (4×10^{-8} M in Diluent A) wurde hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2-5 Min. wurde die Reaktion durch einen gleich großen Volumenteil Serum (FCS) gestoppt. Die Suspension wurde durch Hinzufügen von 4 ml Medium (mit 10% FCS) weiter verdünnt und mehrmals gewaschen (400 x g; 10 Minuten). Nach dem Waschen wurden die Conidien in 1ml Medium (10% Serum) aufge-

nommen und mittels Neubauer-Kammer unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt. Zum Einstellen der Conidien auf 200 000 C./ 20 µl diente ebenfalls serumhaltiges Medium.

3.4 Phagozytose (Gerber et al. 1996; Miyagawa et al. 1997)

Die Fähigkeit der Granulozyten, Keime zu phagozytieren, wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des Phagotest[®]-Testkits bestimmt. Dabei verwendeten wir heparinisiertes Vollblut oder eine Probe des Granulozytenkonzentrates selbst. Die Zahl an Leukozyten mußte zur korrekten Durchführung des Tests bei ca. 7000 Zellen/ µl liegen. Vollblutproben von stimulierten Spendern und Konzentrate mußten daher verdünnt werden. Zur Verdünnung diente zunächst PBS, später Medium mit 10% AB-Serum (siehe Ergebnisteil und Diskussion).

100 µl Blut oder Produkt wurden in 5ml Probenröhrchen aliquotiert und 10 Min. auf Eis vorgekühlt. Anschließend wurden allen Ansätzen 20 µl FITC (Fluorescein-isothiocyanat; Fluoreszenzfarbstoff)-markierte *E.coli* (1×10^9 Bakterien/ml) zugefügt. Die Probenansätze, in denen Phagozytoseaktivität gemessen werden sollte, inkubierten für 10 Min. im Wasserbad bei 37°C, während ein Kontrollröhrchen (Negativkontrolle, keine Phagozytose) auf Eis stehen blieb. Nach dem Quenchen des Reaktionsansatzes und zwei Waschschritten (Quenching Solution und Waschpuffer im Kit enthalten) wurden vorhandene Erythrozyten lysiert (Lysepuffer im Kit enthalten: 20 Min. bei Raumtemperatur im Dunkeln) und der Ansatz abzentrifugiert (5 Min., 4°C, 400 x g). Die DNA der Zellen wurde anschließend mit DNA-Färbelösung (im Kit enthalten) angefärbt und die Phagozytoserate der Granulozyten im Durchflußzytometer bestimmt.

Das Epics-XL/MCL-Durchflußzytometer registrierte im Laserfokus einzelne Ereignisse, die durch ihr gestreutes und emittiertes Licht charakterisiert wurden. Dieses Licht wurde über ein Filter- und Spiegelsystem aufgetrennt und von verschiedenen Detektoren gemessen. Das System maß dabei folgende Parameter und speicherte diese ab:

- | | |
|---|----------------------------------|
| 1. Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter FSC): | Detektion der Zellgröße |
| 2. Seitwärtsstreulicht (Sidescatter SSC): | Detektion der Zellgranularität |
| 3. Grünfluoreszenz (FL1-Kanal): | Fluoreszenz des FITC-Farbstoffes |
| 4. Rotfluoreszenz (FL2-Kanal): | Fluoreszenz des DNA-Farbstoffes |

Die Signale wurden dabei mit folgenden Einstellungen gemessen:

| Signal | Spannung [Volt] | Signalverstärkung |
|--------|-----------------|-------------------|
| FSC | 123 | 5 |
| SSC | 229 | 10 |
| FL1 | 474 | 7,5 |
| FL2 | 500 | 10 |

Für den Diskriminator diente als Sensor der FSC (Wert: 60). Die Fluoreszenzkomensation, die die teilweise Überlagerung der Emissionsspektren des DNA-Farbstoffes und FITC aufhebt, lag für FL1 gegen FL2 bei 0,9 und für FL2 gegen FL1 bei 20,0.

Die mit diesen Geräteeinstellungen ermittelten Spannungswerte wurden einer Analog-Digital-Wandlung (Kanalbreite 10 mV) unterzogen, dadurch entstand für die Fluoreszenzintensität eine Klassifikation von 1024 Kanälen. Das System ermittelte die pro Kanal gemessenen Ereignisse (Counts).

Zur Darstellung wurde für Größe und Granularität der Zellen ein Streulichtdiagramm (Dot-Plot) gewählt, dabei wurde FSC-Lichtintensität (Abszisse; lineare Darstellung) gegen SSC-Lichtintensität (Ordinate; lineare Darstellung) aufgetragen. Die gewünschte Granulozytenpopulation stellt sich dabei als abgrenzbare, zusammenhängende Zellwolke in der Mitte des Diagramms dar. Diese Wolke wurde durch ein Fenster abgegrenzt (Gate A) und nur diese Zellen wurden bei der Auswertung berücksichtigt. Die Messung wurde solange fortgeführt, bis im Gate A 10 000 Ereignisse gezählt waren oder das System nach 300 Sekunden die Messung automatisch stoppte, um die Vergleichbarkeit der Proben untereinander und zu den Negativkontrollen zu gewährleisten.

Die Lichtintensitäten des DNA-Farbstoffes und des FITC-Farbstoffes wurden in je einem Histogramm dargestellt. Dazu wurde die Lichtintensität des entsprechenden Farbstoffes auf der Abszisse (logarithmische Darstellung) gegen die Anzahl der pro Intensität gemessenen Ereignisse auf der Ordinate (lineare Darstellung) aufgetragen.

Während der Datenaufnahme wurde im Histogramm der Rotfluoreszenz (DNA-Farbstoff; FL2-Kanal; Histogramm 2) ein „Live-Gate“ (Marker C) auf diejenigen Ereignisse gesetzt, die

mindestens den DNA-Gehalt einer humanen diploiden Zelle besitzen, um Bakterienaggregate ausschließen zu können, die die gleichen Streulichteigenschaften wie Leukozyten besitzen. Nur diese Zellen wurden dann im Streulichtdiagramm (FSC gegen SSC) dargestellt. Zur Identifizierung der Granulozyten im Streulichtdiagramm (Dot-Plot 1) wurde auf die entsprechende Population wie oben dargestellt Gate A gesetzt. Nur die im Gate A enthaltenen Ereignisse wurden wiederum im Histogramm der Grünfluoreszenz (FITC; FL1-Kanal; Histogramm 3) dargestellt. Durch Analyse der Grünfluoreszenz wurde der prozentuale Anteil derjenigen Granulozyten, die phagozytiert hatten, ermittelt. Dazu wurde das Röhrchen auf Eis verwendet. Im entsprechenden (FITC-) Histogramm der 0°C- Kontrolle wurde ein Marker (Marker B) so gesetzt, daß weniger als 1% der Ereignisse positiv waren. Zur Auswertung der Phagozytoseaktivität wurde diese Markerposition bei der Messung der Testansätze (Inkubation bei 37°C) beibehalten. Zellen, die phagozytiert hatten, also FITC-positiv waren, zeigten entsprechend eine höhere FITC-Lichtintensität. Dadurch wurde der Peak in Histogramm 3 nach rechts verschoben. FITC-positive Zellen lagen demnach also unter Marker B. Der prozentuale Anteil aller unter Marker B liegenden und damit positiver Zellen wurde durch die Software direkt berechnet und konnte abgelesen werden. Zur Korrektur der Werte wurde zur Ergebnisermittlung der Prozentwert der Negativkontrolle von diesem abgelesenen Wert subtrahiert. Die verschiedenen Histogramme und Streulichtdiagramme sind in Abb. 1 a und b dargestellt.

In einer zweiten Testreihe wurden die FITC-markierten *E.coli* durch die FITC-markierten Conidien von *Aspergillus fumigatus* (Anzucht und Markierung siehe oben) ersetzt. Der Versuchsaufbau blieb aber unverändert, die Reagenzien des Phagotest wurden wie oben beschrieben verwendet. Auch die Auswertung im Durchflußzytometer war identisch, lediglich der Stop der Messung war unterschiedlich. Da die Zahl der zur Verfügung stehenden, markierten Conidien begrenzt (200 000 Conidien/ 20 µl) war, mußten die Zellsuspensionen weiter verdünnt werden, um ein Mindestverhältnis von Leukozyten:Conidien von 1:40 zu halten, wie im Phagotest vorgeschrieben. Da aus diesem Grund weit weniger Zellen im Testansatz vorhanden waren, wurde die Messung bei 1000 Zellen oder 300 Sekunden gestoppt.

Abbildungen 1a und 1b: Streulichtdiagramme und Histogramme für die durchflußzytometrische Auswertung des Phagotest.

Abbildung 1a: Phagotest, Negativkontrolle

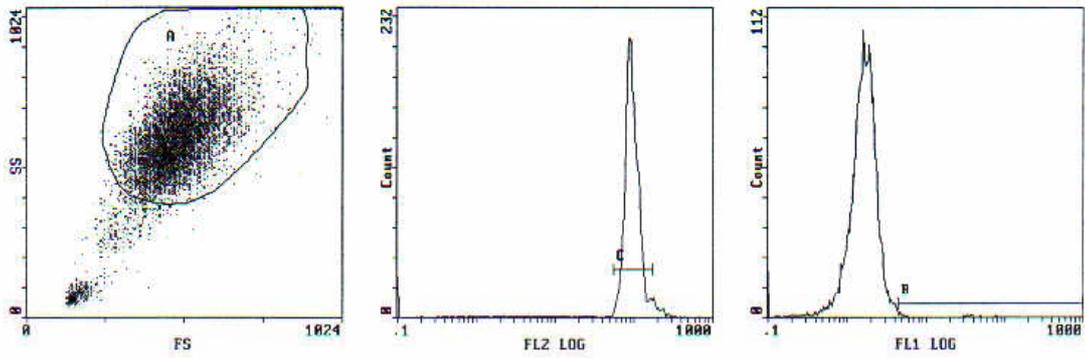
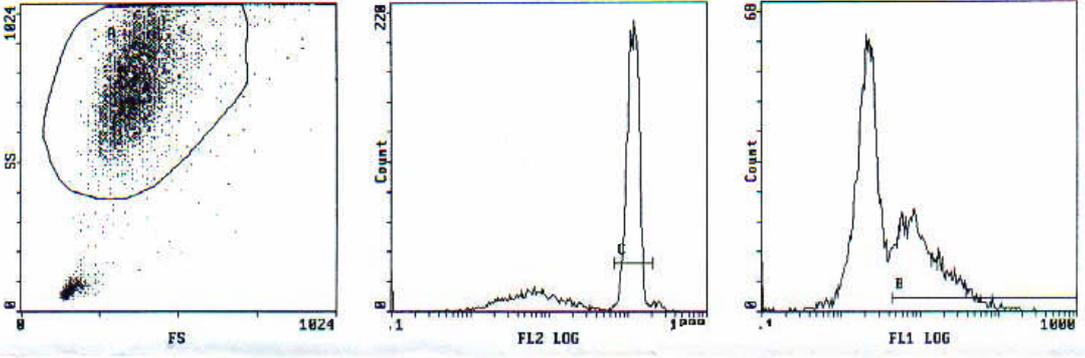


Abbildung 1b: Phagotest, Probenansatz



3.5 Oxidativer Burst (Miyagawa et al. 1997)

Zur Bestimmung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies verwendeten wir den Phagoburst[®]-Testkit. Die Funktionsweise des Kits entspricht in den Grundlagen denen des Phagotests[®]. Heparinisiertes Vollblut wurde in 100 µl Aliquots auf Eis vorgekühlt und mit verschiedenen Stimulantien zur Bildung von Sauerstoffradikalen angeregt. Als Negativkontrolle diente dabei eine Vollblutprobe, der Waschlösung zugesetzt wurde, die Low-Control wurde mit fMLP-Lösung (5 µM), die High-Control mit PMA-Lösung (8,1 µM) stimuliert, als partikulärer Stimulus wurden opsonisierte *E.coli* (1 x 10⁹ Bakterien/ml) verwendet. Die Proben wurden 10 Min. im 37°C-Wasserbad inkubiert, anschließend wurde den Ansätzen Dihydrorhodamin (DHR) als Substrat zugesetzt und für weitere 10 Min. unter gleichen Bedingungen inkubiert. Der Farbstoff wurde durch die gebildeten Sauerstoffverbindungen zu Rhodamin (R) oxidiert. Die Umsetzung von DHR zu R ergab den Prozentsatz an Zellen, die reaktive Sauerstoffspezies gebildet hatten (R positive Zellen). Auch in dieser Testreihe wurden die Zellen nach Erythrozytenlyse und mehreren Waschschritten mit DNA-Farbstoff angefärbt. Die Auswertung erfolgte ebenfalls im Durchflußzytometer. Die Geräteeinstellungen und Parameter entsprachen denen des Phagotests. Im Unterschied zum Phagotest wurde hier im FL1-Kanal nicht FITC, sondern die Lichtintensität des Rhodamins gemessen. Das Setzen der Gates entsprach dem Phagozytose-Test: Humane diploide Zellen wurden über einen Marker im Rotfluoreszenz-Histogramm (DNA-Farbstoff, FL2-Kanal), Granulozyten im Streulichtdiagramm (FSC gegen SSC) identifiziert. Im Histogramm der Grünfluoreszenz (R, FL1-Kanal) konnte der Prozentsatz an Granulozyten ermittelt werden, der reaktive Sauerstoffverbindungen gebildet hatte. Auch hier wurde der Wert der Negativkontrolle von den übrigen Meßwerten subtrahiert.

3.6 Oberflächenantigene

Um den Aktivierungsgrad der Granulozyten zu erfassen, wurde die Expression verschiedener Oberflächenantigene im Durchflußzytometer bestimmt:

| | |
|------------|---|
| CD16-FITC | (Fc-γRIIIA/IIIB; Bindung von IgG-Aggregaten) |
| CD11a-FITC | (Integrin; Adhäsionsmolekül) |
| CD62L-FITC | (L-Selectin; löst Wechselwirkungen zw. Endothel und Leukozyten aus) |
| CD64-FITC | (Fc-γRI; Bindung von IgG mit hoher Affinität) |

Zur Identifizierung der relevanten Granulozytenpopulation diente:

CD14-PE (Bindung von IgG)

Die Bestimmung erfolgte dabei über Zweifarben-Immunofluoreszenz: CD14-PE (CD14 markiert mit Phycoerythrin; Fluoreszenzfarbstoff) wurde verwendet, um die Granulozyten im Rotfluoreszenz-Histogramm (PE-Farbstoff; FL2-Kanal; Histogramm 1) zu identifizieren, indem die CD14-positiven Monozyten ausgeschlossen wurden (siehe unten). Gleichzeitig wurden die Proben (heparinisiertes Vollblut) mit je einem der oben aufgezählten FITC-markierten Antikörper angefärbt. Als Isotyp-spezifische Negativkontrolle diente IgG1-FITC/IgG2a-PE. Die Analyse erfolgte im Durchflußzytometer. Mit Hilfe der Negativkontrolle wurde im Histogramm der Rotfluoreszenz Marker A auf CD14-negative Ereignisse gesetzt. Dadurch wurden die CD14-positiven Monozyten ausgegrenzt und die CD14-negativen Granulozyten identifiziert. Im Histogramm der Grünfluoreszenz (FITC-Farbstoff; FL1-Kanal; Histogramm 2) wurde Marker B auf FITC-positive Ereignisse gesetzt.

Signale wurden mit folgenden Einstellungen gemessen:

| Signal | Spannung [Volt] | Signalverstärkung |
|---------------|------------------------|--------------------------|
| FL1 | 620 | 1 |
| FL2 | 593 | 1 |

Die Kompensation war sowohl für FL1 gegen FL2 als auch für FL2 gegen FL1 null.

FITC-positive Ereignisse, d.h., Zellen, die das zu messende Antigen auf ihrer Oberfläche exprimierten, zeigten eine erhöhte FITC-Lichtintensität und lagen daher unter dem Marker B.

Wie bereits bei *Phagozytose* beschrieben ermittelte die Software den prozentualen Anteil der positiven Zellen. Auch hier wurde der Wert der Negativkontrolle subtrahiert.

Abb.2: Histogramme für die durchflußzytometrische Auswertung der Oberflächenantigene (Negativkontrolle)

2a: Rotfluoreszenz

2b: Grünfluoreszenz

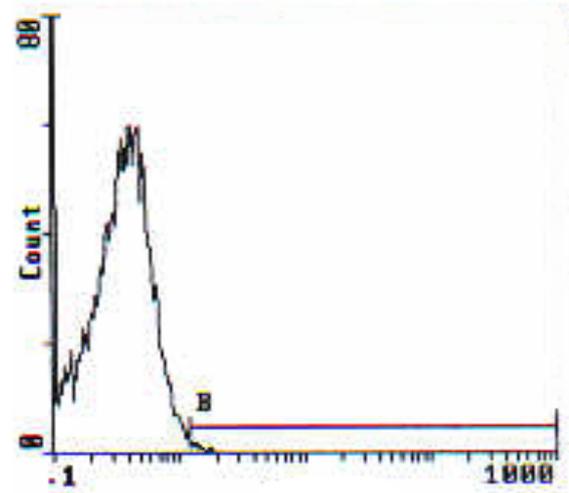
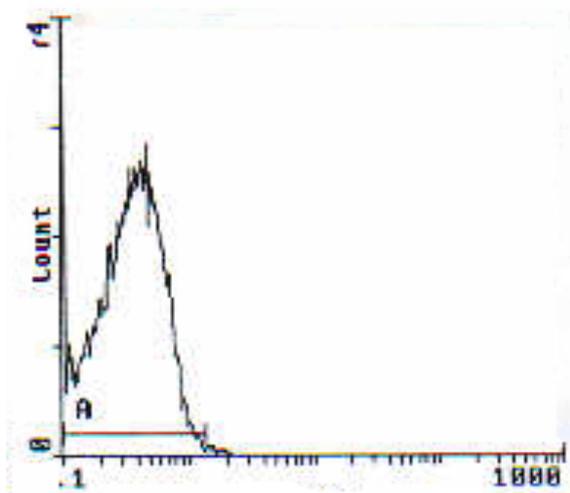
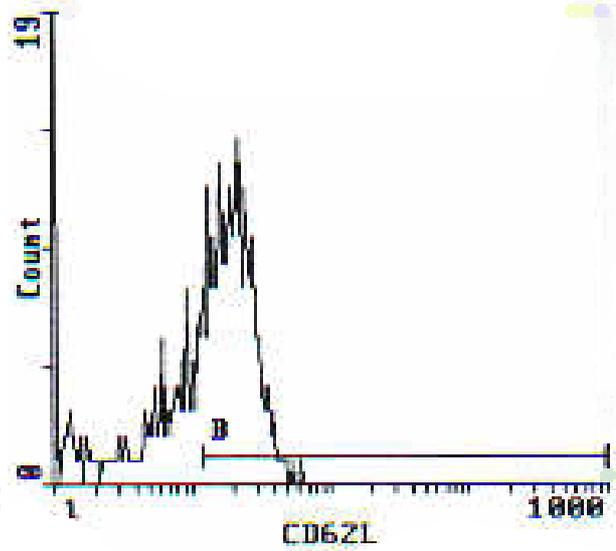
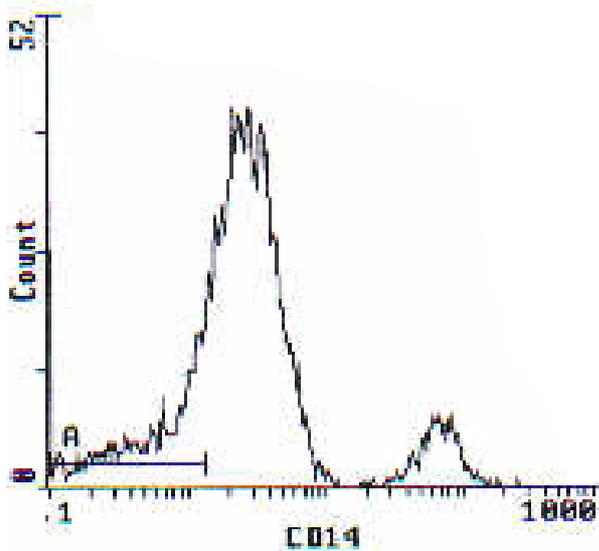


Abb.3: Histogramme für die durchflußzytometrische Auswertung der Oberflächenantigene (Beispiel für einen Marker; hier CD62L)

3a: Rotfluoreszenz (CD14)

3b: Grünfluoreszenz (hier CD62L)



3.7 Zytokinmessung

Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α , sowie das chemotaktische Zytokin IL-8 wurden mit Standard-ELISA-Technik quantifiziert. Die Zytokine wurden im Plasma des Spenders vor G-CSF-Gabe und vor Apherese sowie im Produktüberstand bestimmt.

3.8 Stimulus-response-coupling (Laufer et al. 1995)

In dieser Meßreihe wurde die Fähigkeit der Zellen untersucht, nach Stimulation LTB₄ zu produzieren.

Dazu wurden die Granulozyten wie oben beschrieben mittels Polymorphprep isoliert, in Medium/FCS resuspendiert und auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Jeweils 0,8 ml wurden in Kryoröhrchen aliquotiert und im Wasserbad bei 37°C 10 Min. vorinkubiert. Anschließend wurden 200 μ l CaCl₂-Lösung (10mM in 0,8% NaCl-Lsg.) zupipettiert und weitere 5 Minuten im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 10 μ l Ca-Ionophore (1 mg/ml in DMSO) wurde erneut 3 Minuten inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Röhrchen sofort in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur Verwendung im ELISA bei -80°C eingefroren. Vor der Quantifizierung im ELISA wurden die Proben abzentrifugiert (1500 upm, 10 Minuten).

3.9 Granulozytenagglutinationstest (GAT) (Bux et al 1997)

Im Agglutinationstest wurden die Granulozyten des Spenders gegen das Serum des Empfängers getestet. Hatte der Empfänger Antikörper gegen die Granulozyten des Spenders gebildet, die in seinem Serum nachweisbar waren, so bildeten sich in Gegenwart der Spenderzellen Aggregate, die unter dem Mikroskop sichtbar wurden. Der GAT war allerdings nicht spezifisch für granulozytäre Antikörper, sondern wurde auch bei Vorliegen von HLA-Antikörpern positiv.

Zur Durchführung des Tests wurden die Granulozyten aus dem Spendervollblut (vor und nach G-CSF-Gabe), sowie aus dem Produkt wie oben beschrieben isoliert. Nach Erythrozytenlyse und mehreren Waschschritten (Bedingungen für die Zentrifuge: 1300 upm, 10 Minuten) mit Medium/10% FCS wurden die Zellen abzentrifugiert (identische Bedingungen) und in autologem Plasma resuspendiert. Die Zellzahl wurde am Cell-Dyne[®] Blutbildautomaten (Abbot, Wiesbaden) bestimmt und mit autologem Plasma auf 5000 Zellen/ μ l eingestellt.

2 µl dieser Zellsuspension wurden auf eine geölte Terasaki-Platte überführt. Jede Probe wurde dabei doppelt angesetzt, d.h. jeweils 2 Ansätze mit Zellen des Spenders aus Vollblut vor G-CSF-Gabe, 2 Ansätze mit Granulozyten nach G-CSF-Gabe und 2 Ansätze mit Zellen aus dem Produkt. Zu dieser Zellsuspension wurden jeweils 4 µl Patientenserum pipettiert. Als Negativkontrolle wurde AB-Serum verwendet. Als Positivkontrolle diente das Serum eines Patienten, der nachweislich granulozytäre Antikörper gebildet hatte (Serum freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Bux, Abteilung Transfusionsmedizin der Universität Gießen). Da dieses Serum stark positiv reagierte, wurden lediglich 2 µl zur Granulozytensuspension zupipettiert.

Die Ansätze inkubierten anschließend bei 37°C im Brutschrank (90% relative Feuchte, 5% CO₂). Die Platten wurden nach 2 Stunden unter dem Mikroskop erstmals beurteilt, der Ansatz inkubierte weiter über Nacht im Brutschrank (identische Bedingungen) und wurde dann erneut ausgewertet.

3.10 Granulozyten-Immunfluoreszenz-Test (GIFT) (Bux et al. 1997)

Auch im GIFT wurden Granulozyten des Spenders gegen Serum des Patienten getestet. Bei Vorliegen granulozytärer Antikörper im Patientenserum wurden die Spenderzellen während der Inkubationszeit mit diesen (IgG-) Antikörpern des Patienten beladen. Anschließend wurde FITC-markierter Anti-IgG-Antikörper zugegeben und der Ansatz im Durchflußzytometer ausgewertet.

Zur Durchführung des Tests wurden die Granulozyten aus Vollblut vor und nach G-CSF-Gabe sowie aus dem Produkt wie oben beschrieben isoliert. Nach Erythrozytenlyse und zwei Waschschritten mit Medium/ 10% FCS (Bedingungen für die Zentrifuge: 1300 upm und 10 Minuten), wurden die Zellen mit 0,5 ml Cellfix[®]-Gebrauchslösung (Becton Dickinson, Heidelberg) nach Vorschrift des Herstellers fixiert. Nach 5 Minuten Inkubation (Raumtemperatur, im Dunkeln) wurden die fixierten Zellen abzentrifugiert (800 upm, 5 Minuten) und in ca. 1 ml PBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde am Cell-Dyne[®] Blutbildautomaten bestimmt und mit PBS auf 5000 Zellen/µl eingestellt.

40 µl Patientenserum wurden in eine ELISA-Rundbodenplatte pipettiert (doppelter Ansatz). 40 µl der Granulozytensuspension wurden zugefügt und die Ansätze gut gemischt. Als Negativkontrolle diente erneut AB-Serum. Als Positivkontrolle wurde in einem zusätzlichen Well das Patientenserum durch den monoklonalen Antikörper CD16 (10µl) ersetzt (Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich). Dieser Antikörper (Isotype IgG1, Maus-anti-human-

notech, Marseille, Frankreich). Dieser Antikörper (Isotype IgG1, Maus-anti-human-Antikörper) band an den Fc γ RIII-Rezeptor auf humanen Granulozyten.

Die Testreihe inkubierte im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 90% relative Feuchte) für 30 Minuten, anschließend wurden die Ansätze abzentrifugiert (1200 upm, 30 Sekunden) und dreimal mit PBS gewaschen (Bedingungen für die Zentrifuge identisch). Nach dem letzten Waschen wurde der Überstand möglichst vollständig dekantiert. Zu jedem Ansatz wurden dann 40 μ l FITC-markierter Anti-IgG-Antikörper zugefügt (Kaninchen-Antikörper gegen humanen IgG; im Falle der Positivkontrolle gegen Maus-IgG). Nach 30 Minuten Inkubation (identische Bedingungen) und 3 Waschschrinen (PBS; Bedingungen für die Zentrifuge identisch) wurden die Zellen in 150 μ l PBS resuspendiert und jeder Ansatz in ein separates Polystyrolröhrchen überführt. Die Auswertung erfolgte im Durchflußzytometer: Die relevante Granulozytenpopulation wurde im Streulichtdiagramm (lin Forward-Scatter gegen lin Sideward-Scatter) aufgrund von Größe und Granularität identifiziert und gated. Mit Hilfe der Negativkontrolle wurde im Diagramm der Grünfluoreszenz (FITC-Kanal, FL1-Kanal) ein Marker B so gesetzt, daß weniger als 1% der Ereignisse positiv waren. Zur Messung der zu testenden Proben wurde die Markereinstellung beibehalten. Aus dem Diagramm der Grünfluoreszenz konnte so der prozentuale Anteil der FITC-positiven und damit derjenigen Zellen abgelesen werden, die IgG-Antikörper auf ihrer Oberfläche gebunden hatten.

Die Messungen wurden unter folgenden Einstellungen des Durchflußzytometers vorgenommen:

| Signal | Spannung [Volt] | Signalverstärkung |
|--------|-----------------|-------------------|
| FSC | 100 | 5 |
| SSC | 53 | 20 |
| FL1 | 512 | 7,5 |
| FL2 | 500 | 10 |

Die Kompensation war in diesem Falle für FL1 gegen FL2 bei 0,9, für FL2 gegen FL1 bei 20,0. Die Messung wurde in diesem Versuch beendet, wenn 10 000 Zellen gezählt oder der automatische Stop nach 300 Sekunden erreicht waren.

3.11 PCR zur Typisierung granulozytärer Antigene

Nachdem mit Hilfe von GAT und GIFT die Möglichkeit bestand, das Serum des Patienten auf granulozytäre Antikörper zu testen, sollte zusätzlich eine Testmethode etabliert werden, die die Bestimmung der genauen Antigen-spezifität dieser Antikörper zuließ. Dazu mußten Zellen von Spendern vorhanden sein, deren Antigenmuster bekannt war. Dieses Antigenmuster wurde durch die im folgenden beschriebene klassische Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) bei verschiedenen unstimulierten Spendern bestimmt.

Bei der PCR wird ein bestimmter DNA-Abschnitt gezielt vervielfältigt und kann dann mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht und identifiziert werden. Dazu müssen mindestens die ersten und die letzten 15 Basenpaare des Ziel-DNA-Abschnitts bekannt sein. Zwei Oligonukleotide, die die zu diesen beiden Abschnitten komplementäre Basensequenz aufweisen, werden als sogenannte Primer verwendet. Im Versuchsansatz zur PCR werden die Ziel-DNA, die beiden Primer, eine DNA-Polymerase, die den neuen DNA-Strang am freien 3'-OH-Ende verlängern kann, und die verschiedenen Desoxynukleotide, die Bausteine der neuen DNA, gemischt. Zunächst wird die DNA durch Erhitzen auf 92-95°C denaturiert, d.h. in beide Einzelstränge zerlegt. Die beiden Primer binden in einem zweiten Temperaturschritt antiparallel an die ihnen komplementären DNA-Abschnitte. In einem dritten Temperaturschritt verlängert die DNA-Polymerase unter Verwendung der Desoxynukleotide die Primer, so daß der gewünschte DNA-Abschnitt, der durch die Primer eingegrenzt wird, vervielfältigt wird.

Die hier beschriebene Methode typisierte den Fc γ RIII-Rezeptor, der den Polymorphismus NA1/NA2 aufweist. Dazu wurden als Primer der erste Abschnitt des DNA-Strangs, der für NA1 codiert (SSP5-NA1, sog. NA1-Vorwärtsprimer) und der erste Abschnitt für NA2 (SSP1-NA2; sog. NA2-Vorwärtsprimer), sowie der beiden gemeinsame Abschnitt des DNA-Strangs verwendet, der beide Genabschnitte beendet, verwendet (SSP3; sog. NA1/NA2-Rückwärtsprimer). Zusätzlich wurden dem Ansatz Vorwärts und Rückwärtsprimer für das Human Growth Hormon zugesetzt (HGHI und HGIII), um den korrekten Ablauf der PCR überprüfen zu können.

DNA aus isolierten Granulozyten wurde nach Standardmethode mit Hilfe des EZNA Blood DNA-Kit[®] (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) nach Vorschrift des Herstellers isoliert. Zur PCR wurden ca. 200 bis 400 ng DNA eingesetzt.

Folgende Bestandteile wurden zum sogenannten „PCR-Mix“ zusammengemischt:

25 µl JumpStart REDTaq Ready Mix (enthält die Polymerase und die Desoxynukleotide in einem Puffergemisch)

5 µl HGHI Primer (1,25 pmol/µl)

5 µl HGIII Primer (1,25 pmol/µl)

5 µl SSP5 NA1 Vorwärtsprimer oder SSP1 NA2 Vorwärtsprimer (5 pmol/ml)

5 µl SSP3 NA1/NA2-Rückwärtsprimer (5 pmol/µl)

5 µl DNA- Lösung

Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz aus allen Reagenzien verwendet, dem keine DNA zugesetzt wurde. Als Positivkontrollen wurde DNA aus Granulozyten eines Spenders verwendet, der heterozygot auf NA1 und NA2 war. Für die Typisierung der Merkmale NA1 und NA2 wurden jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle, sowie eine Probe der zu typisierenden DNA angesetzt.

Die Bedingungen für die PCR folgten Standardeinstellungen. Insgesamt liefen 30 Zyklen zur DNA-Vervielfältigung ab. Ein Zyklus bestand aus folgenden Schritten: 30 Sekunden 94°C (DNA-Denaturierung), 1 Minute 57°C (Anlagerung der Primer), 30 Sekunden 72°C (DNA-Synthese). Nach 30 Zyklen wurde die PCR weitere 5 Minuten auf 72°C gehalten und anschließend bei 4°C bis zur Verwendung in der Gelelektrophorese gelagert.

Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurde ein Agarosegel hergestellt (1,5% in Einfach-TAE-Puffer; s. Abschnitt Material). Das Gel wurde direkt in die verwendete Elektrophoresekammer gegossen und härtete innerhalb einer Stunde bei Raumtemperatur aus. Zur Größeneinschätzung und Identifizierung der synthetisierten DNA-Abschnitte lief eine Basenpaarleiter auf dem Gel mit, die DNA-Abschnitte mit Größen zwischen 154 und 2176 Basenpaaren zeigte (Molecular Weight Marker Nr. VI, Roche Diagnostics, Mannheim). Die Basenpaarleiter wurde in wässriger Lösung eingesetzt (1 µl Basenpaarleiter, 4 µl Aqua dest., 1 µl Loading Buffer). Proben (je 10 µl) wurden in folgender Reihenfolge aufgetragen:

| | |
|-------------|-----------------------------------|
| Slot-Nr. 1: | Basenpaarleiter |
| 2: | Probe, Typisierung NA1 |
| 3: | Positivkontrolle, Typisierung NA1 |
| 4: | Negativkontrolle |
| 5: | Probe, Typisierung NA2 |
| 6: | Positivkontrolle, Typisierung NA2 |

Die Elektrophorese lief bei 80 Volt und 250 mA über 60 Minuten.

Das Gel wurde anschließend aus der Kammer entnommen und im Ethidiumbromidbad (0,1% in wäßriger Lsg.) angefärbt. Unter UV-Bestrahlung konnten die einzelnen Banden im Gel sichtbar gemacht und fotografiert werden. Durch Vergleich mit den Positivkontrollen und der Negativkontrolle konnte so bei jeder einzelnen Probe bestimmt werden, ob der Spender homozygot NA1 oder NA2 oder heterozygot für beide Merkmale war.

3.12 Monoclonal-antibody-specific immobilization of granulocyte antigens (MAIGA-Assay) (Bux et al. 1992)

In diesem Assay wurden Granulozyten, die im GAT und GIFT positiv reagierten, auf den genauen Typ der vorliegenden granulozytären Antikörper getestet. Beim MAIGA-Test handelt es sich um die enzymimmunologische Bestimmung granulozytärer Antikörper durch spezifische Immobilisierung von Granulozyten-Antigenen durch monoklonale Antikörper.

Bei dieser Versuchsanordnung wurde eine ELISA-Platte mit einem polyklonalen Ziege-Anti-Maus-IgG-Antikörper beschichtet. In einem zusätzlichen Probengefäß wurden zunächst die zu testenden Patientensera mit typisierten Granulozyten inkubiert. Lagen im Patientenserum granulozytäre Antikörper vor, so reagierten diese mit den Granulozyten und bildeten Immunkomplexe. Anschließend wurde ein monoklonaler Antikörper (Maus-Anti-Mensch) zugegeben, der gegen ein Epitop auf der gleichen Granulozytenmembran gerichtet war. Nach einer Inkubationszeit und mehreren Waschschritten wurden die Granulozyten lysiert. Das Lysat, das Membranfragmente der Granulozyten enthielt, wurde dann auf die beschichtete Platte übertragen. Der Immunkomplex reagierte, indem der gebundene monoklonale Antikörper (Maus-Anti-Mensch) vom Antikörper auf der Platte (Ziege-Anti-Maus) gebunden wurde. Die zunächst solubilisierten Antigen-Antikörper-Komplexe wurden so an die Festphase (Platte) gebunden. Anschließend fügte man einen enzymmarkierten Anti-human-IgG-Antikörper (Ziege) hinzu, der an die gebundenen Patientenantikörper band. Zugewetztes Substrat wurde durch das Enzym umgesetzt, der damit verbundene Farbumschlag konnte im Photometer sichtbar gemacht werden. Fand also eine Antigen-Antikörper-Reaktion statt, so wurde diese durch Farbentwicklung sichtbar. Fand diese Reaktion nicht statt, weil im Serum des Patienten keine Antikörper vorhanden waren, so blieb der Farbumschlag aus.

Zur Durchführung des MAIGA-Tests wurden Granulozyten von zwei typisierten Spendern (siehe Abschnitt PCR) wie oben beschrieben isoliert, fixiert und mit PBS/2% FCS auf 1×10^6 Zellen/100 μ l eingestellt. Dabei mußte mindestens einer der Spender homozygote Anlagen besitzen, um die Spezifität der Antikörper im Patientenserum nachweisen zu können.

Zuerst wurden Flachbodenmikrotiterplatten mit Ziege-Anti-Maus-IgG-Antikörper beschichtet (3µg IgG/ml in Coating Puffer; siehe Abschnitt Material; 100 µl pro Well). Die Platten mußten mindestens 3 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C aufbewahrt werden. Zu testende Seren wurden bei 3500 upm für 5 Minuten abzentrifugiert.

Als monoklonale Antikörper wurden in unserem Versuchsaufbau CD16 (Maus-IgG1, Klon 3G8, gerichtet gegen den FcγRIII-Rezeptor, Antigene NA1 und NA2; Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich) und 7D8 (gerichtet gegen den Rezeptor GP 50-64, Antigen NB1; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Bux, Transfusionsmedizin der Uniklinik Gießen) verwendet.

In eine zweite Flachboden-Mikrotiterplatte wurden jeweils 50 µl Patientenserum und 50 µl (für 7D8) oder 100 µl (für 3G8) Granulozytensuspension pipettiert. Für jeden monoklonalen Antikörper wurde eine Negativkontrolle (typisierte Granulozyten mit AB-Serum), zwei Proben (zu testende Seren mit den typisierten Granulozyten) und eine Positivkontrolle (typisierte Granulozyten und Serum von Spendern mit nachgewiesenen Antikörpern; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Bux, Transfusionsmedizin der Universität Gießen) angesetzt. Patientenserum und Granulozyten inkubierten für 30 Minuten im Brutschrank (90% relative Feuchte, 5% CO₂). Nach Zugabe von 50 µl PBS/0,2% FCS wurde 5 Minuten bei 500g abzentrifugiert, der Überstand wurde dekantiert. Zum Pelett wurden hinzugefügt: 50 µl PBS/0,2% FCS und 10 µl monoklonaler Antikörper (0,01 mg/ml). Danach folgte erneut eine Inkubationszeit von 30 Minuten (gleiche Bedingungen). Danach wurden die Ansätze dreimal mit je 150 µl PBS/0,2% FCS gewaschen (Bedingungen für die Zentrifuge: 3 Minuten, 500g). Nach dem letzten Waschen mußte der Überstand möglichst vollständig dekantiert werden.

Durch Zusatz von 100 µl Lysepuffer mit Inhibitoren (siehe Abschnitt Material) wurden die Granulozyten lysiert, der Inhalt der einzelnen Wells wurde in Eppendorff-Cups überführt und bei 4°C für 30 Minuten gekühlt.

In dieser Zeit wurde die Flüssigkeit von der beschichteten Platte abgeschüttelt, pro Well wurden 200 µl PBS/ 0,2% FCS zugegeben und die Platte für mindestens 1 Stunde bei 4°C aufbewahrt. In Mikrotubes wurden 180 µl MAINA-Waschpuffer/0,2% FCS (siehe Abschnitt Material) vorbereitet und ebenfalls bei 4°C gelagert.

Die Eppendorff-Cups mit den Zelllysaten wurden nach Ablauf der Inkubationszeit 30 Minuten bei 15 000 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde anschließend in die vorbereiteten Mikrotubes mit MAINA-Waschpuffer überführt. Die beschichtete Platte wurde 5 mal mit

PBS/Tween 20 0,05% gewaschen, 100 µl Lysat wurden pro Well auf die Mikrotiterplatte überführt (Doppelwerte).

Als Leerwert wurde ein Reagenzienleerwert (alle Reagenzien, keine Zellen, kein Serum) mitgeführt. Der Ansatz blieb dann über Nacht bei 4°C im Kühlschrank.

Am nächsten Morgen wurde die Platte 5 mal mit PBS/Tween 20 0,05% gewaschen. Pro Well wurden 100 µl Ziege-Anti-Mensch-IgG-Antikörperlösung (Peroxidase-markiert, Originallösung 1:4000 verdünnt mit MAINA-Waschpuffer/ 0,2% FCS, siehe Abschnitt Material). Die Platte inkubierte anschließend 2 Stunden bei 4°C und wurde danach sechsmal mit PBS/Tween 20 0,05% gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl Substratlösung (4 OPD-Tabletten in 12 ml Aqua dest. und 5 µl H₂O₂ 30 %) wurde die Reaktion nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten (Raumtemperatur, im Dunkeln) mit je 100 µl 4N H₂SO₄ gestoppt. Der Ansatz wurde im Photometer bei 492 nm gemessen. Die optische Dichte der einzelnen Ansätze wurde durch Subtraktion der Leerwerte ermittelt. Durch Vergleich mit den optischen Dichten der Positiv- und Negativkontrollen wurde ermittelt, ob die Proben positiv reagierten, d.h. ob die Patientenserum Antikörper aufwiesen.

3.13 Statistik

Die Ergebnisse der einzelnen Versuche wurden mit Hilfe zweier verschiedener Methoden ausgewertet:

Im ersten Schritt (im folgenden Ergebnisteil „einfache Auswertung“ genannt) wurden Mittelwerte und resultierende Standardabweichungen gebildet. Dazu wurden alle Voruntersuchungen aller Spender für jeden Versuch zu einem Mittelwert mit Standardabweichung zusammengefaßt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen für die erste bis vierte G-CSF-Stimulation sowie die korrespondierenden ersten bis vierten Granulozytenkonzentrate wurden ebenfalls aus den Werten aller Spender zusammengefaßt. Aufgrund der fehlenden Normalverteilung und konstanten Streuung ließ sich eine Varianzanalyse zur Ermittlung statistisch signifikanter Unterschiede nicht durchführen.

In einer zweiten Auswertung wurden die Ergebnisse paarweise miteinander verglichen (im Ergebnisteil als „paarweiser Vergleich“ bezeichnet). Dazu wurden die nach G-CSF-Stimulation gewonnenen Werte mit Hilfe der JUMP[®]-Statistik-Software mit dem vor G-CSF-Gabe ermittelten Wert desselben Spenders verglichen. Die ersten bis vierten Konzentrate wurden dann mit den Werten der ersten bis vierten Stimulation desselben Spenders verglichen, d.h., z.B. Werte für das Produkt 1 des Spenders A mit den Werten nach G-CSF-

Stimulation 1 von Spender A usw. Aus den so errechneten Werten aller Spender wurden anschließend wiederum Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet.

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz konnte bei der Auswertung über den paarweisen Vergleich der beidseitige t-Test durchgeführt werden. Statistisch signifikant waren Ergebnisse dann, wenn der im t-Test ermittelte p-Wert kleiner/gleich 0,05 ($p \leq 0,05$) war.

III. Ergebnisse

1. Granulozytenkonzentrate und klinisches Outcome

1.1 Granulozytenkonzentrate- Zusammensetzung

Die nach dem Tübinger Protokoll gewonnenen Präparate wurden hinsichtlich ihrer Reinheit und ihres Zellgehaltes überprüft. Dazu wurde jedes Präparat zur Volumenermittlung gewogen und die Zusammensetzung des Konzentrates mittels Blutbildautomaten bestimmt (Cell Dyne 300, Abbott, Wiesbaden). Dieses Hämozytometer bestimmt nach dem Prinzip des Durchflußzytometers die enthaltenen Zellpopulationen und ihren Anteil am Gesamtgehalt des Präparates. Tabelle 1 vermittelt eine Übersicht über die Zusammensetzung der untersuchten Präparate. Dabei wurden nur Präparate berücksichtigt, die in unsere Messungen eingegangen waren. Zusätzlich zu den verschiedenen Werten der Produkte wurde die Zahl der Granulozyten in die Tabelle aufgenommen, die nach G-CSF-Applikation im peripheren Blut der Spender gemessen wurden („PMN vor Apherese“). Der Granulozytengehalt der Präparate wurde zum einen als Anzahl der Zellen pro μl („PMN [$10^3/\mu\text{l}$]“) als auch als Absolutgehalt im gesamten Produkt angegeben („PMN absolut [10^{10}]“). Der Thrombozytengehalt wurde in der Tabelle als Zahl der Plättchen im ganzen Konzentrat („PLT absolut [10^{11}]“), der Gehalt an eosinophilen und basophilen Granulozyten und an Monozyten sowohl als Zellen/ μl als auch in Prozent des Gesamtleukozytengehalts angegeben.

Der Hämoglobingehalt im Produkt („Hb [g/dl]“) kann ebenfalls der Tabelle entnommen werden.

Tabelle1: Zusammensetzung der Granulozytenpräparate

| Messung | Mittelwert | Standardabweichung | n |
|---------------------------------------|------------|--------------------|-----|
| PMN vor Apherese [10^3 / μ l] | 27,5 | 9,7 | 103 |
| Volumen [ml] | 312,7 | 51,7 | 97 |
| WBC [10^3 / μ l] | 194,9 | 76,7 | 103 |
| PMN [10^3 / μ l] | 161,1 | 68,9 | 101 |
| PMN absolut [10^{10}] | 5,0 | 2,0 | 93 |
| Reinheit [%] | 80,4 | 9,9 | 101 |
| PLT absolut [10^{11}] | 1,2 | 0,3 | 96 |
| Hb [g/dl] | 1,7 | 0,8 | 103 |
| Eosinophile [10^3 / μ l] ([%]) | 0,9 (0,6) | 0,9 (1,1) | 87 |
| Basophile [10^3 / μ l] ([%]) | 0,8 (0,6) | 0,4 (1,1) | 87 |
| Monozyten [10^3 / μ l] ([%]) | 13,6 (7,4) | 6,9 (2,6) | 87 |

Nach der Stimulation mit Neupogen[®] stieg die Anzahl der Granulozyten im peripheren Blut der Spender auf durchschnittlich $27,5 \times 10^3$ Granulozyten/ μ l. Geht man von einem Normalwert von 1800 bis 7000 Granulozyten/ μ l aus (Hahn 1998), so entspricht dies einem Faktor von 3,9 bis 15,3, um den die Zahl der Zellen zunahm.

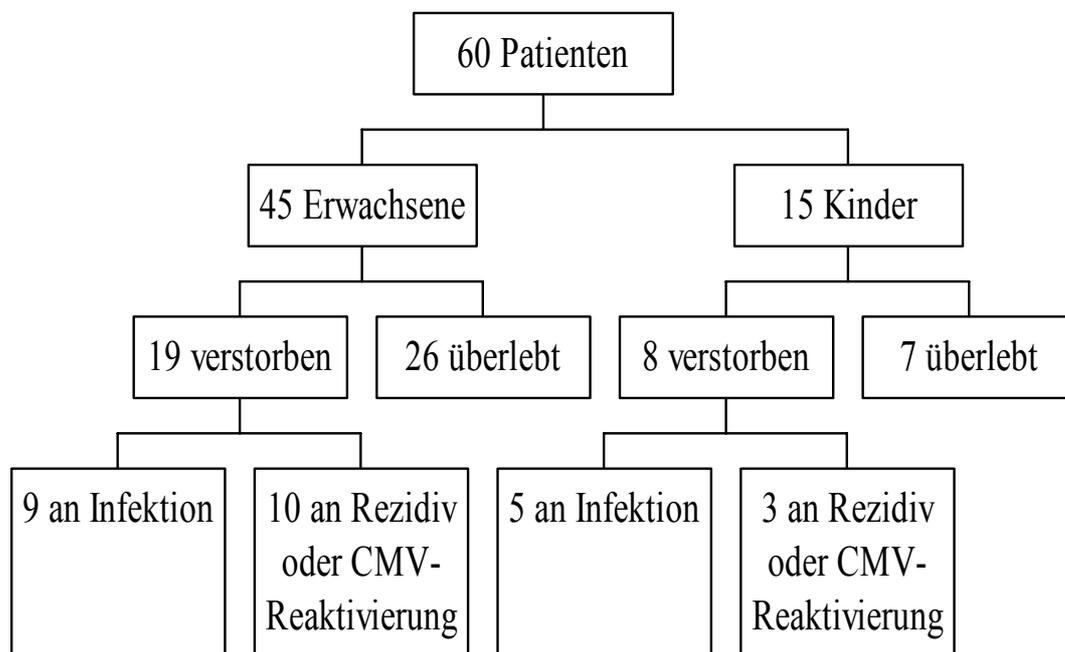
Das durchschnittliche Volumen der Präparate betrug 312,7 ml. Die Zahl der gewonnenen Leukozyten lag im Durchschnitt bei $194,9 \times 10^3$ Zellen/ μ l, davon waren $161,1 \times 10^3$ neutrophile Granulozyten. Dies entsprach einer Reinheit von 80,4 %. Der mittlere Gehalt an Eosinophilen lag bei $0,9 \times 10^3$ Zellen/ μ l (entsprechend 0,6 % des Gesamtleukozytengehalts), der Gehalt an Basophilen bei $0,8 \times 10^3$ Zellen/ μ l (1,1 %). Monozyten waren durchschnittlich mit $13,6 \times 10^3$ Zellen/ μ l (7,4%) im Präparat enthalten.

Der Absolutgehalt an neutrophilen Granulozyten betrug durchschnittlich $5,0 \times 10^{10}$ Zellen. Im ganzen Präparat waren außerdem im Mittel $1,2 \times 10^{11}$ Thrombozyten enthalten, der Hämoglobingehalt betrug 1,7 g/dl.

1.2 Klinisches Outcome

Bei der Auswertung der Patientendaten konnte ein positives Outcome für die Transfundierten beobachtet werden: 45 Patienten und 15 Kinder erhielten eine oder mehrere Granulozy-

tentransfusionen. 19 erwachsene (42,2 %) und 8 pädiatrische (53,3 %) Patienten starben, davon lediglich 9 Erwachsene (20,0 %) und 5 Kinder (33,3 %) aufgrund einer Infektion trotz Transfusion. 10 der Erwachsenen und 3 der Kinder starben, weil sie einen Rückfall ihrer Grunderkrankung erlitten oder durch eine Reaktivierung des Zytomegalievirus (CMV; vgl Flußdiagramm 1).



Flußdiagramm 1: Klinisches Outcome der Patienten

2. Anzucht und FITC-Markierung von *Aspergillus fumigatus*- Conidien

Insgesamt wurden vier Ansätze des Stammkeimes angezchtet und die so gewonnenen Conidien FITC-markiert.

Tabelle 2 liefert eine Übersicht über die Ausbeute nach der Markierung der Conidien und die Endkonzentration an Conidien, die schließlich im Testsystem verwendet wurde. Die markierten Conidien wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop mittels Neubauer-Kammer ausgezählt. Die Conidien der ersten beiden Anzuchten (10.01. und 26.01.) dienten zur Etablierung des Testsystems. Dabei wurde die Verdünnung der Conidien auf ca. 10000/μl als optimal festgestellt. Die Anzucht am 11.04.00 sollte eine große Menge an Conidien hervorbringen, daher wurde die sechsfache Menge angezchtet, die in sechs Röhrchen abgeerntet wurde (hier als Kulturen eins bis sechs bezeichnet). Die auf ca. 10000 Conidien/μl verdünnten (Medium: RPMI 1640, HEPES-gepuffert, 10% FCS) markierten Conidien wurden bis zur Verwendung in Kryoröhrchen (2ml) bei -20°C gelagert. Die aufgetauten Röhrchen wurden dann aliquotiert (100μl) und wieder bei -20°C eingefroren. Diese Vorgehensweise entsprach den Empfehlungen für die FITC-*E.coli* aus dem Phagotest®.

Tabelle 2: Markierung und Verdünnung der *Aspergillus fumigatus*-Conidien

| Datum | Ausbeute nach Markierung [Conidien/μl] | Endkonzentration [Conidien/μl] |
|--------------|---|--|
| 10.01.00 | 28860 | 25000 |
| 26.01.00 | 10318 | 10318 |
| 28.02.00 | 10570 | 10570 |
| 11.04.00 | 14380 (Kultur 1) 680875 (Kultur 2) 82925 (Kultur 3) 644500 (Kultur 4) 24775 (Kultur 5) 104400 (Kultur 6) | 10000 10000 10000 10000 10000 10000 |

3. Funktionstests bei Spendern und in Konzentraten, einfache Auswertung

Die im folgenden beschriebenen Ergebnisse wurden wie im Kapitel Statistik (siehe „Material und Methoden“) beschrieben nach der einfachen Auswertung ermittelt. Die Graphiken stellen die Ergebnisse vor Spenderkonditionierung mit Neupogen[®] (x = 0; hellgrauer Balken), nach der Spenderkonditionierung mit Neupogen[®] (x = 1,2,3,4; hellgraue Balken) und aus den korrespondierenden Produkten (x = 1,2,3,4; dunkelgraue Balken) dar. „X = 0“ bedeutet demnach unstimulierter Spender („nullte“ G-CSF-Gabe), die Zahlen „x = 1 bis 4“ zeigen die erste bis vierte G-CSF-Gabe bzw. das entsprechende erste bis vierte Produkt.

3.1 Chemotaxis

Die Granulozyten aus Spendervollblut und aus den Konzentraten zeigten weder im Agarosegel-Assay (Abbildung 1a) noch im Boydenkammer-Assay (Abbildung 1b) signifikante Veränderungen der induzierten Migration. Weder die Stimulation der Zellen mit G-CSF noch die Apherese beeinflussten diese Funktion der Zellen in statistisch signifikanter Weise.

Die Wanderstrecke im Agarosegel blieb durch die Neupogen[®]-Gabe weitgehend unbeeinflusst (Abb. 1a, hellgraue Balken), die Produkte 1 und 2 zeigten zunächst eine leicht erhöhte Wanderstrecke, die Produkte 3 und 4 aber wieder eine im Vergleich zu Zellen nach Neupogen[®]/vor Apherese verminderte Wanderstrecke (Abb. 1a, dunkelgraue Balken). Aufgrund hoher Standardabweichungen waren diese Beobachtungen aber nicht statistisch signifikant.

Die Anzahl der wandernden Granulozyten im Boydenkammer-Assay (Abb. 1b) wurde durch die Applikation von G-CSF zunächst zunehmend vermindert (1. bis 3. G-CSF-Gabe), nach der vierten Gabe stieg die Zellzahl aber wieder an. Die Produkte verhielten sich ähnlich: Im Vergleich mit Zellen aus Vollblut nach Neupogen[®]-Stimulation zeigten die ersten drei Produkte zunehmend schlechtere Ergebnisse, während im vierten Produkt annähernd gleichviele Zellen wanderten, wie in der Probe aus Vollblut der Spender nach der vierten G-CSF-Gabe. Sowohl die Zellen nach der vierten G-CSF-Applikation als auch die Zellen aus dem vierten Produkt zeigten im Boydenkammer-Assay annähernd das gleiche Verhalten, wie Zellen unstimulierter Spender.

Die in den Abbildungen dargestellten Ergebnisse stellen die reine chemotaktische Wanderung dar, d.h., die spontane Migration wurde bereits von der induzierten Migration subtrahiert.

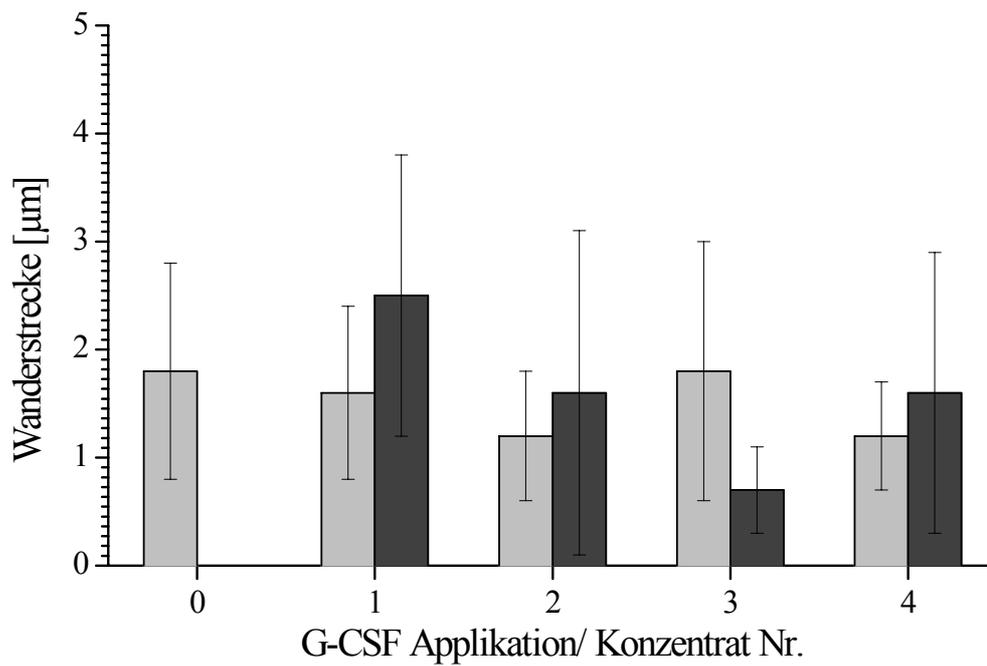


Abb.1a: Chemotaxis-Wanderung unter Agarose : Wanderstrecke [µm] der Granulozyten als Differenz zwischen spontaner und induzierter Migration

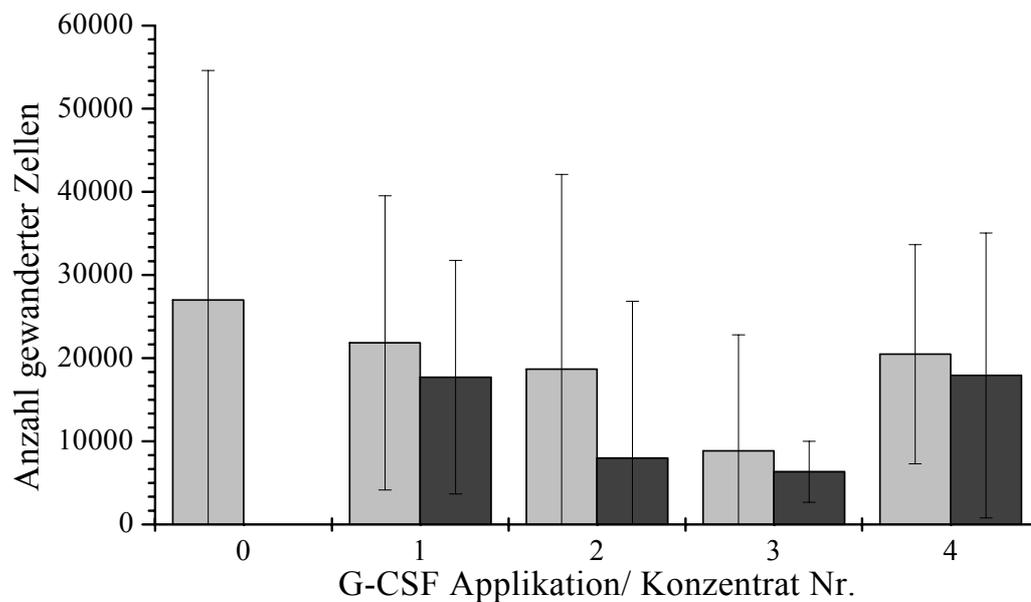


Abb. 1b: Chemotaxis- Boydenkammer-Assay: Anzahl der durch Filterporen gewanderten Zellen als Differenz zwischen spontaner und induzierter Migration

3.2 Phagozytose

3.2.1 Phagozytose FITC-markierter E.coli

Da die Vollblutproben der Spender nach G-CSF-Stimulation und die Konzentrate eine stark erhöhte Zahl an Granulozyten aufwiesen, wurden diese Proben wie bereits oben (siehe „Material und Methoden“) erwähnt verdünnt, um den Bedingungen des Testkits gerecht zu werden. In ersten Versuchen wurde dazu PBS verwendet.

Die Auswertung der mit PBS verdünnten Proben ergab eine stark verminderte Phagozytoseaktivität der Granulozyten, die in den Konzentraten enthalten waren (Abbildung 2a). Vergleich man Granulozyten aus Vollblut vor G-CSF-Stimulation mit Zellen nach G-CSF-Gabe, so konnten keine signifikanten Unterschiede in der Phagozytoseaktivität festgestellt werden, wenn auch eine leichte Abnahme nach G-CSF-Gabe zu beobachten war. Die in-vivo-Stimulation der Spender mit Neupogen[®] zeigte somit keinen Einfluß auf die Fähigkeit der Zellen, *E.coli* zu phagozytieren. Auch die mehrmalige Gabe von G-CSF hatte keine Auswirkungen auf die Zellen.

Im Unterschied dazu waren die Ergebnisse bei Granulozyten aus den Konzentraten im Vergleich zu Zellen vor und nach G-CSF-Gabe stark verändert und die Phagozytose war signifikant geringer als bei Zellen vor und nach G-CSF-Stimulation. Betrachtete man die Ergebnisse aus den Konzentraten, so zeigten diese vom ersten zum vierten Produkt hin eine leichte, aber nicht signifikante Abnahme in der Phagozytoseaktivität.

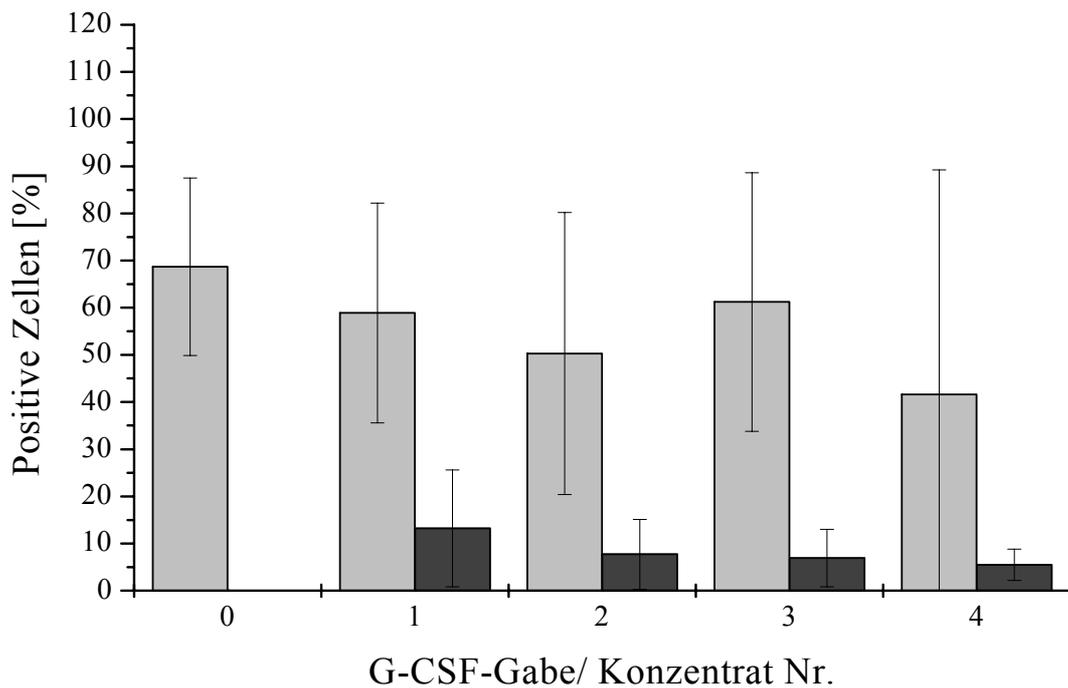


Abb. 2a: Phagozytose FITC-markierter *E.coli*; prozentualer Anteil phagozytischer Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl; Proben verdünnt mit PBS

Um ausschließen zu können, dass die Verdünnung mit PBS Einfluß auf die Ergebnisse nimmt, wurden die Proben in einer weiteren Versuchsreihe mit Medium verdünnt (RPMI 1640, HEPES-gepuffert; mit 10% AB-Serum).

Auch hier war zu sehen, dass die Stimulation der Spender mit G-CSF keinen signifikanten Einfluß auf die Phagozytoseleistung der Granulozyten hatte (Abbildung 2b). Beim Vergleich zwischen Granulozyten der noch unstimulierten Spender und den Zellen der Spender nach Neupogen[®]-Gabe konnte kein signifikanter Unterschied detektiert werden. Dennoch war eine leichte Zunahme der Phagozytose nach G-CSF-Gabe zu beobachten.

Die Zellen aus den Konzentraten zeigten auch hier eine leichte Verminderung in der Phagozytoseleistung, die allerdings deutlich geringer ausfiel als bei Konzentraten, die mit PBS verdünnt wurden (vgl. Abb. 2a und 2b) und die lediglich beim vierten Konzentrat signifikant war. Auch hier zeigte die Zellen eine leicht abnehmende Tendenz in der Phagozytose vom ersten zum vierten Produkt hin, doch auch diese Beobachtung war nicht statistisch signifikant.

Vergleich man die Werte aus Konzentraten mit den Werten vor G-CSF-Stimulation der Spender, so konnte kein Einfluß der Apherese auf die Leistung der Granulozyten erkannt werden.

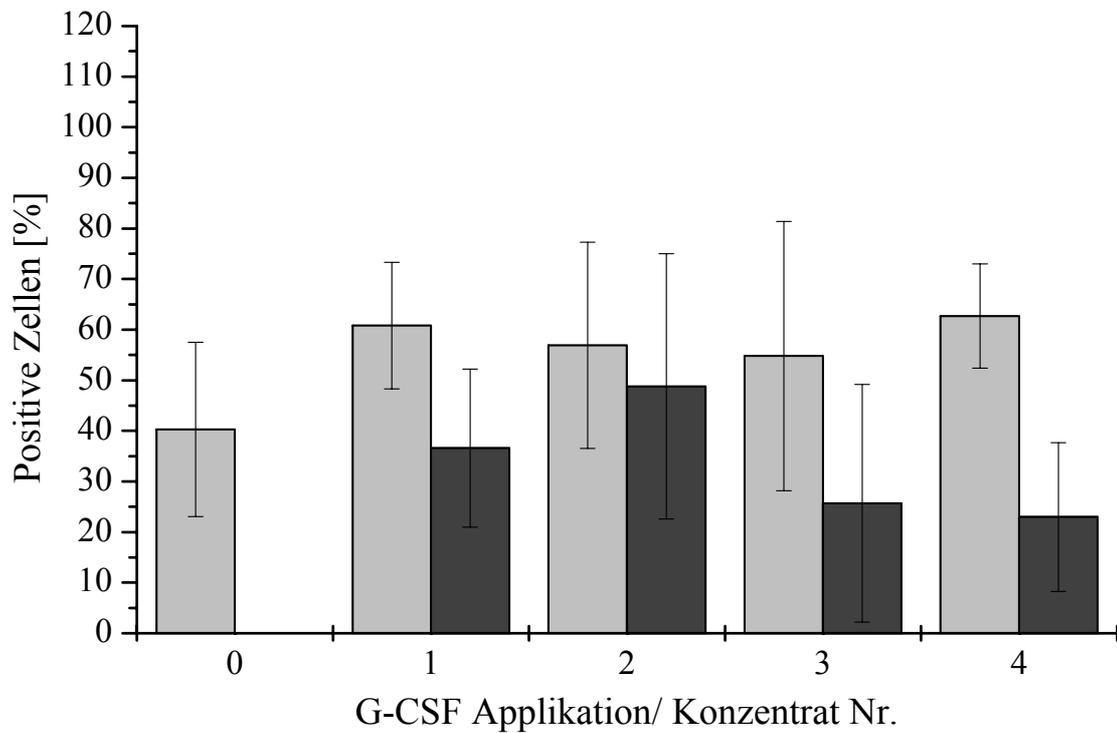


Abb. 2b: Phagozytose FITC-markierter *E.coli*; prozentualer Anteil phagozytierender Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl; Proben mit Medium verdünnt

3.2.2 Phagozytose FITC-markierter Conidien von *Aspergillus fumigatus*

Da wie unter „Material und Methoden“ beschrieben nur eine begrenzte Anzahl Conidien zur Verfügung stand, mußten alle Proben, d.h., Proben vor und nach G-CSF-Stimulation der Spender und Konzentrate, verdünnt werden. Dazu wurde Medium (RPMI 1640, HEPES-gepuffert) mit 10% FCS verwendet.

Auch auf die Phagozytose von Conidien hatten weder die G-CSF-Stimulation noch die Apherese einen signifikanten Einfluß (Abbildung 3). Vergleich man Werte nach G-CSF-Stimulation mit Werten der unstimulierten Spender, so konnte ein leichter Anstieg in der Phagozytoserate detektiert werden. Die Werte der Produkte waren mit denen nach G-CSF-Gabe vergleichbar und daher ebenfalls im Vergleich zu unstimulierten Spendern leicht erhöht.

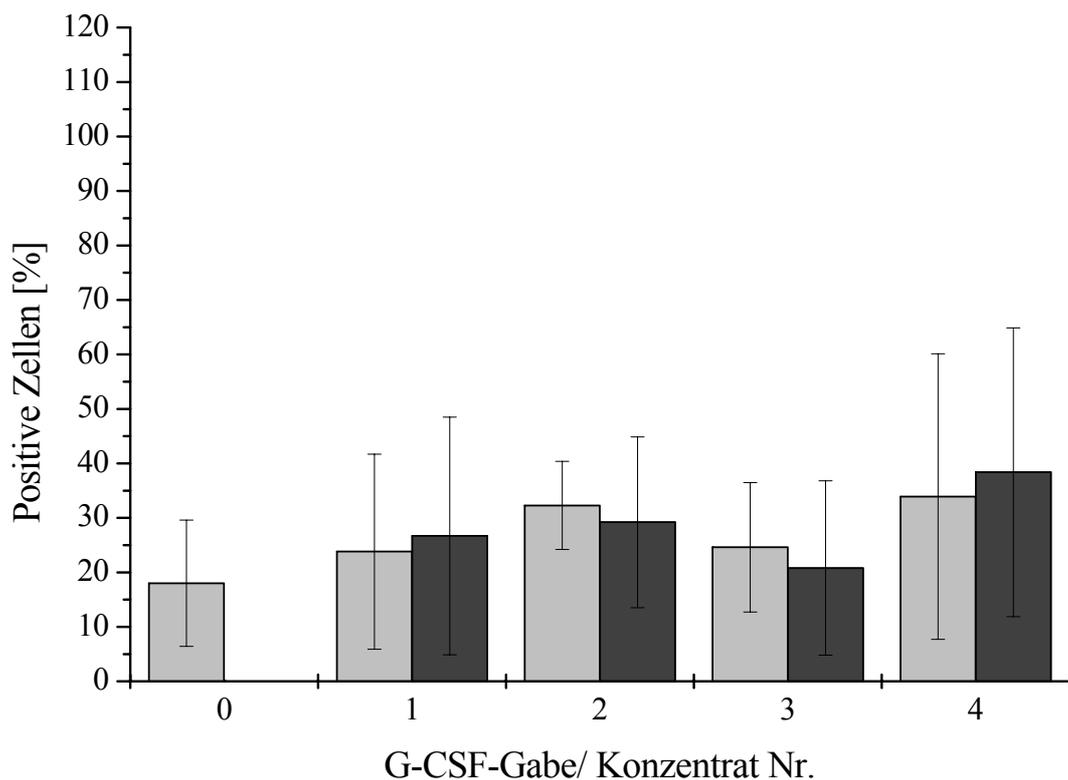


Abb.3: Phagozytose FITC-markierter Conidien von *Aspergillus fumigatus*, prozentualer Anteil phagozytierender Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl

3.3. Oxidativer Burst

3.3.1 Stimulation mit E.coli

Auch in dieser Versuchsreihe mußten die Proben, die nach G-CSF-Stimulation und aus den Konzentraten entnommen wurden, verdünnt werden, um die Zahl der Leukozyten auf ca. 7000/ μ l einzustellen. Wie beim Phagotest[®] wurden diese Verdünnungen zuerst mit PBS hergestellt.

Betrachtete man die Ergebnisse des Bursttest/E.coli nach PBS-Verdünnung (Abb.4a), so konnte nur nach der vierten G-CSF-Gabe ein statistisch signifikanter Unterschied zu unstimulierten Spendern detektiert werden. Die Ergebnisse nach der vierten Neupogen[®]-Gabe zeigten einen stark verminderten respiratorischen Burst nach Stimulation mit E.coli.

Die Granulozyten aus Konzentraten zeigten im Vergleich zu Werten nach der entsprechenden G-CSF-Stimulation ein stark eingeschränktes Vermögen, reaktive Sauerstoffspezies zu produzieren. Die Werte waren bis auf die vierte Stimulation statistisch signifikant schlechter als vor Apherese, so dass hier ein negativer Einfluß der Apherese angenommen werden mußte. Auch im Vergleich zu Werten vor G-CSF-Gabe waren die Produkte statistisch signifikant schlechter, was ihre Fähigkeit betraf, Sauerstoffradikale zu generieren. Auffällig war auch, dass zwischen dem ersten und dem zweiten bis vierten Produkt ein deutlicher Abfall in der meßbaren Produktion an Radikalen zu beobachten war.

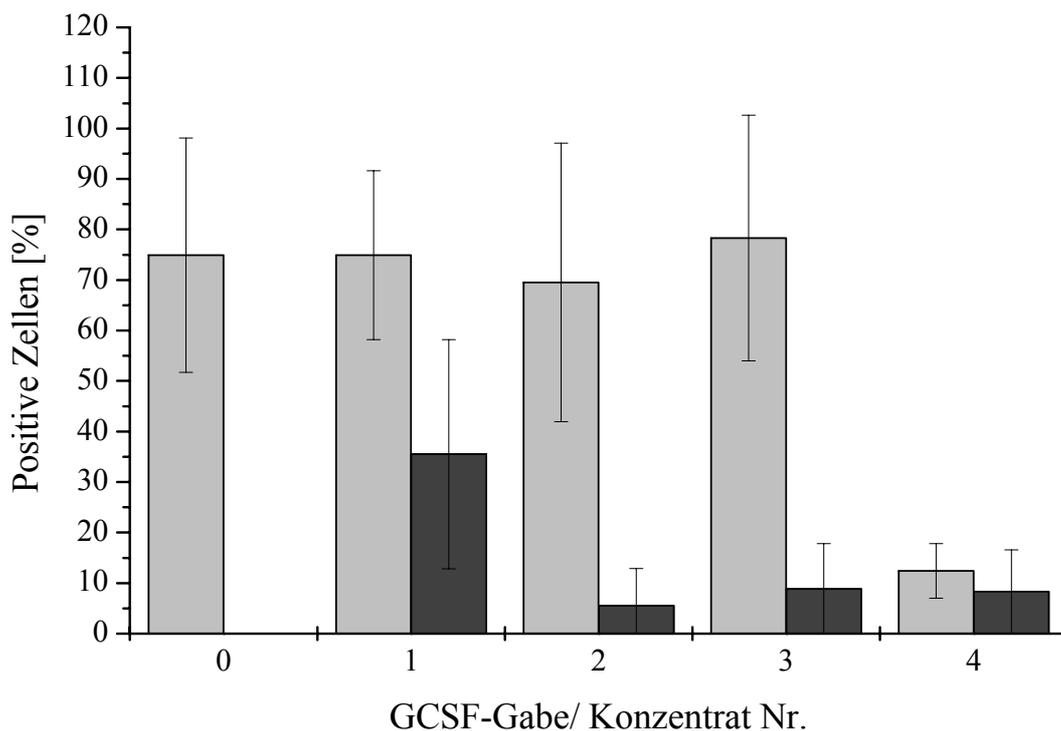


Abb. 4a: Oxidativer Burst nach Stimulation mit *E.coli*, prozentualer Anteil der Radikale produzierenden Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl; Verdünnung der Proben mit PBS

Um auch in dieser Versuchsreihe den Einfluß der Verdünnung mit PBS auf die Werte zu testen, wurden in einer zweiten Versuchsreihe die Proben nach G-CSF-Stimulation und die Konzentrate mit Medium (RPMI 1640 mit 10% AB-Serum) verdünnt (Abbildung 4b).

Dabei konnte ein deutlicher Einfluß der PBS-Verdünnung sichtbar gemacht werden:

Zellen aus Vollblut nach G-CSF-Stimulation zeigten hier eine leichte, aufgrund der hohen Standardabweichung unstimulierter Zellen aber nicht signifikante Erhöhung des oxidativen Bursts nach Stimulation mit *E.coli*.

Die Tendenz eines leicht reduzierten oxidativen Bursts in den Konzentraten im Vergleich zu Werten nach G-CSF-Gabe war lediglich im vierten Produkt statistisch signifikant. Im Vergleich mit Ergebnissen vor G-CSF-Stimulation konnte aber kein Einfluß der Apherese auf die Granulozyten detektiert werden.

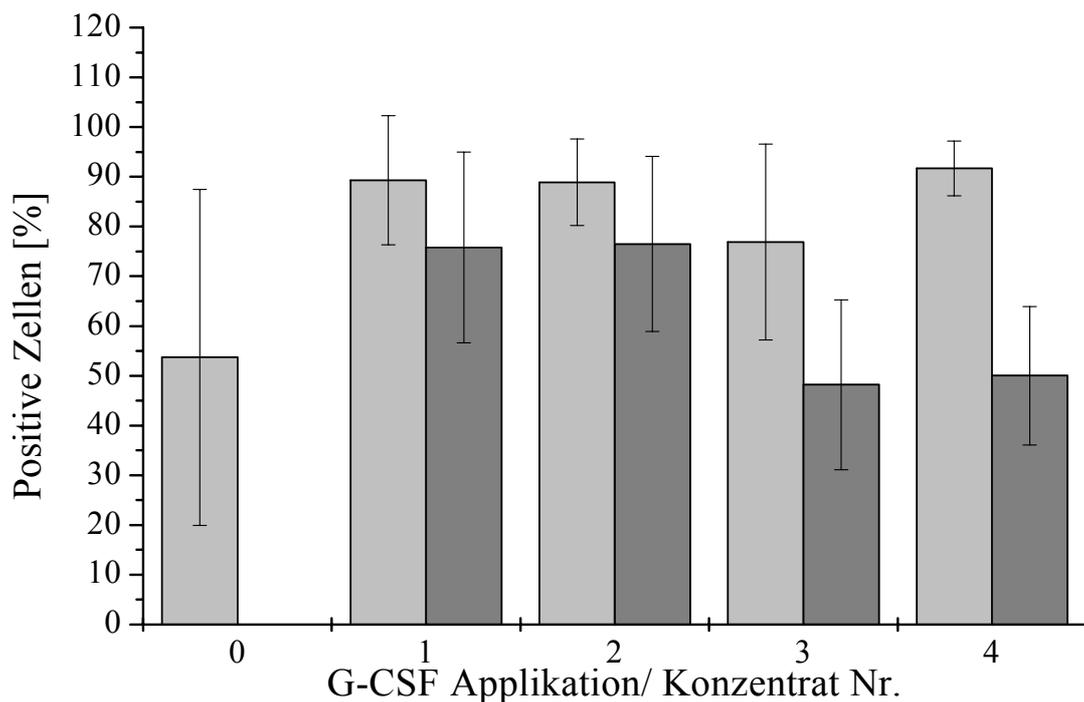


Abb. 4b: Oxidativer Burst nach Stimulation mit *E.coli*, prozentualer Anteil der Radikale produzierenden Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl; Verdünnung der Proben mit Medium

3.3.2 Stimulation mit *f*-MLP

Die Granulozyten wurden in dieser Versuchsreihe mit dem bakteriellen Protein Formylmethionin-leucin-phenylalanin als „low stimulus“ zur Produktion von Sauerstoffradikalen angeregt. Zur Messung der Radikalproduktion wurde wieder Vollblut eingesetzt und der Bursttest[®] verwendet. Die Proben, die nach G-CSF-Gabe und aus den Konzentraten gewonnen worden waren, wurden ebenfalls zunächst mit PBS, später mit Medium (RPMI 1640, HEPES-gepuffert, 10% AB-Serum) verdünnt.

Vergleich man die Werte aus PBS-verdünnten Proben (Abbildung 5a) nach G-CSF-Gabe mit den Werten aus Proben vor der Neupogen[®]-Applikation, so zeigt sich ein leichter Anstieg in der Radikalproduktion bis zur dritten Spender-Konditionierung. Nach der vierten G-CSF-Gabe produzierten die Zellen weniger reaktive Sauerstoffverbindungen als in unstimulierten Spendern. Alle Ergebnisse waren jedoch nicht statistisch signifikant.

Die Konzentrate zeigten ebenfalls eine ansteigende Tendenz, d.h., vom ersten zum vierten Produkt hin konnte im Vergleich zu unstimulierten Spendern eine immer größer werdende Radikalproduktion detektiert werden (Ergebnisse statistisch nicht signifikant). Vergleich man die Konzentrate mit den Werten nach Neupogen[®]-Applikation, so produzierten die Konzentrate im gleichen Maß reaktive Sauerstoffspezies wie die Zellen aus stimulierten Spendern vor Apherese. Lediglich beim vierten Produkt war eine deutlich höhere Radikalproduktion als in der Vollblutprobe nach G-CSF-Gabe zu erkennen. Auch diese Werte waren aber nicht statistisch signifikant.

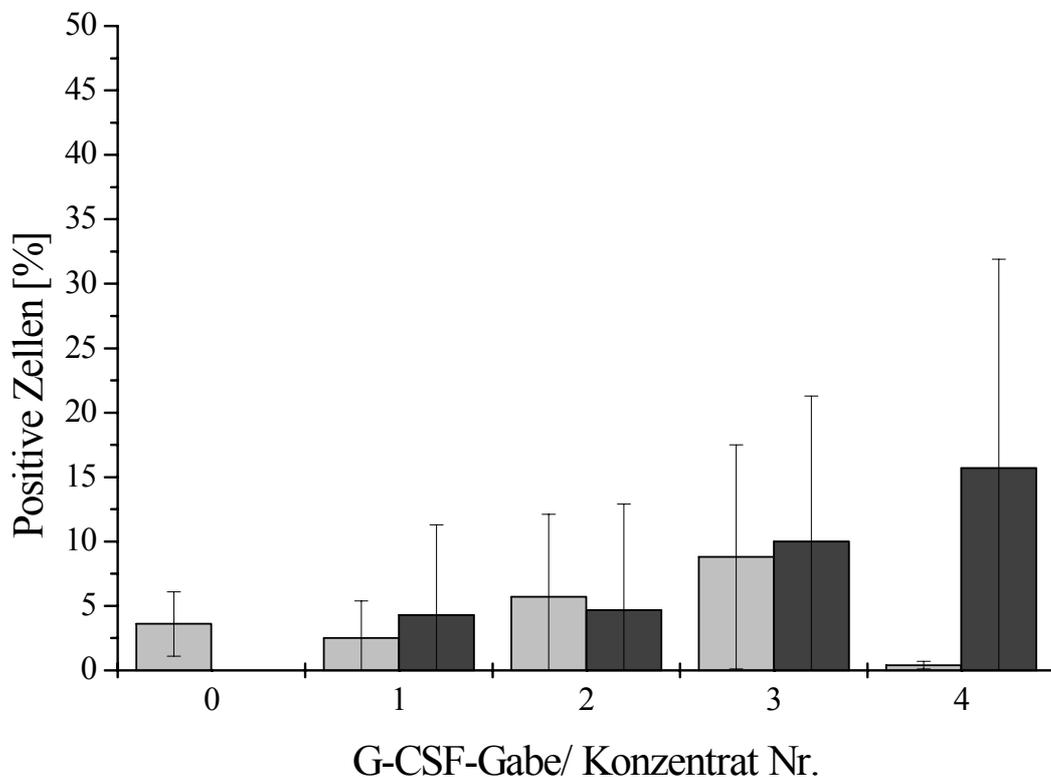


Abb. 5a: Oxidativer Burst nach Stimulation mit f-MLP, prozentualer Anteil der Radikale produzierenden Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl; Verdünnung der Proben mit PBS

Anschließend wurde auch diese Versuchsreihe mit Medium-verdünnten Proben (RPMI 1640, HEPES-gepuffert, 10 % AB-Serum) durchgeführt (Abbildung 5b).

Auch hier zeigte sich im Vergleich zwischen Proben vor G-CSF-Gabe und Proben nach der Spender-Konditionierung, dass G-CSF-Gabe die Zahl der Granulozyten, die reaktive Sauerstoffspezies bildeten, erhöhte. Auch in den Konzentraten generierten mehr Zellen Sauerstoffradikale als in den Proben unstimulierter Spender. Diese Ergebnisse waren aber sowohl für stimulierte Spender als auch für Konzentrate nur im Fall der vierten Neupogen®-Applikation bzw. beim vierten Konzentrat statistisch signifikant, fielen jedoch deutlicher aus als in der Versuchsreihe, in der mit PBS verdünnt wurde.

Die Apherese hatte nach diesen Versuchen keinen Einfluß auf die Zahl der radikalbildenden Zellen. Die Konzentrate zeigten nur geringfügige, statistisch nicht relevante Unterschiede zu Zellen aus Vollblutproben vor Apherese.

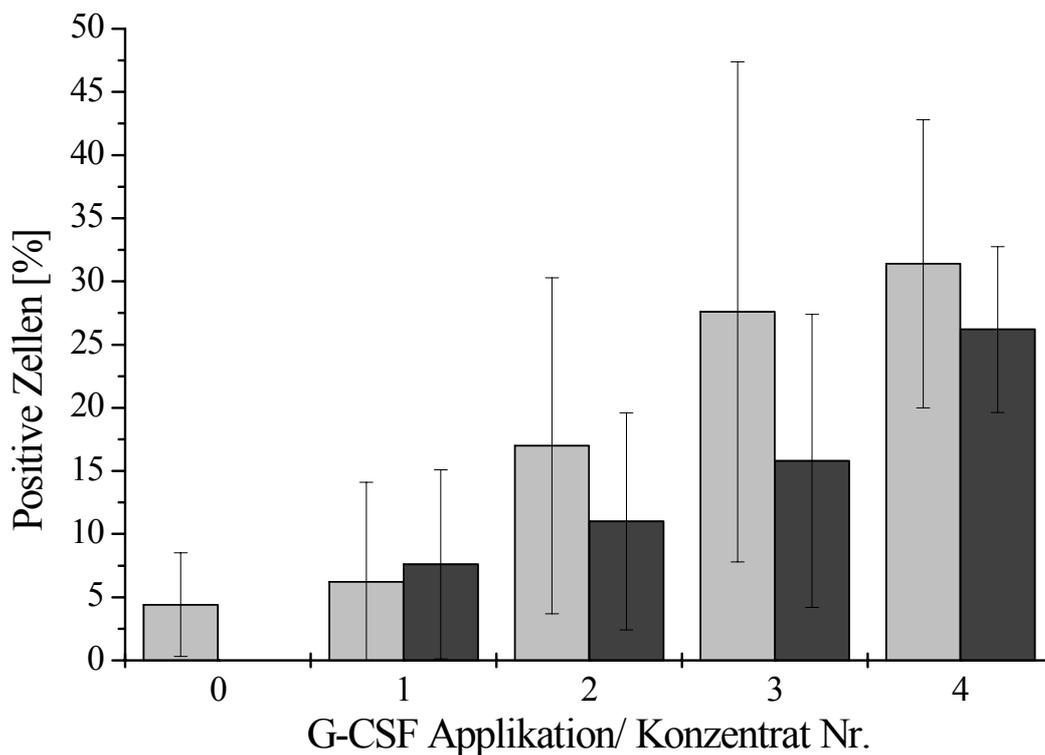


Abb. 5b: Oxidativer Burst nach Stimulation mit f-MLP, prozentualer Anteil der Radikale produzierenden Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl; Verdünnung der Proben mit Medium

3.4 Oberflächenantigene, Aktivierungsmarker

G-CSF verminderte die Expression von CD11a und CD62L auf der Oberfläche der Granulozyten, aber die Werte erholten sich in den Granulozytenkonzentraten, wo sie wieder mit Ergebnissen vor Neupogen[®]-Gabe vergleichbar waren (Abbildungen 6b und c). Auffällig war hier, dass diese Herunterregulation vor allem nach der ersten und der vierten G-CSF-Stimulation zu erkennen war. Die gleiche Tendenz ließ sich auch bei CD16 und CD64 zeigen (Abbildungen 6a und d). Auch hier wurden beide Marker nach in-vivo-G-CSF-Stimulation der Spender herunterreguliert. Die Zellen aus den Granulozytenkonzentraten dagegen zeigten eine z.T. sogar höhere Markerexpression als die Zellen unstimulierter Spender. Aufgrund der hohen Standardabweichungen unterschieden sich die Ergebnisse aber statistisch nicht signifikant von Werten vor G-CSF-Applikation (Abbildungen 6a und d).

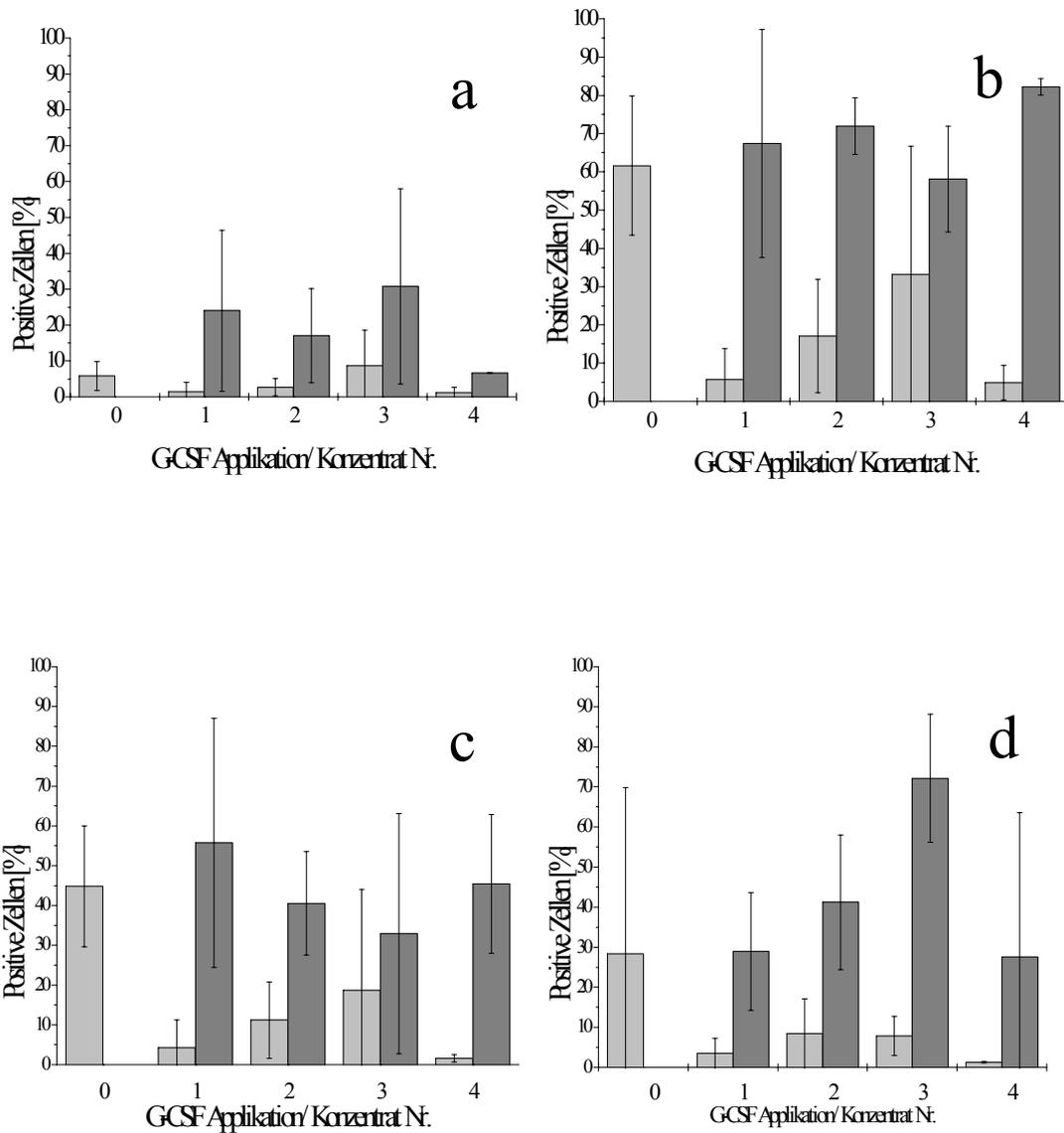


Abb. 6: Expression von Oberflächenantigenen: prozentualer Anteil der Antigen-positiven Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl

- a: Expression CD16 (FcγRIII)
- b: Expression CD11a (Integrin)
- c: Expression CD62L (L-Selectin)
- d: Expression CD64 (FcγRI)

3.5 Zytokine

Weder in Plasma von Spendern vor und nach G-CSF-Gabe noch in den Überständen der Granulozytenkonzentrate konnten signifikante Mengen an IL-1 β , IL-6 und TNF- α detektiert werden (Tabelle 3).

Tendenziell zeigten sich erhöhte IL-8-Werte in den Produktüberständen, die jedoch aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht statistisch signifikant waren. Im Plasma der Spender, das vor und nach G-CSF-Stimulation gewonnen wurde, konnten keine erhöhten IL-8-Level nachgewiesen werden (Abbildung 7).

| | | Zytokin [pg/ml] | | | | |
|---------------------------|----------|-------------------------------|----------|-----------------------------|----------|-------------------------------|
| | | IL-1β | | IL-6 | | TNFα |
| Quelle | n | MW\pmSD | n | MW\pmSD | n | MW\pmSD |
| Plasma vor der G-CSF-Gabe | 9 | 0.4 \pm 0.9 | 9 | 0.7 \pm 0.1 | 5 | 0.0 \pm 0.0 |
| Plasma nach 1. G-CSF-Gabe | 13 | 0.6 \pm 0.9 | 13 | 1.0 \pm 1.5 | 14 | 1.2 \pm 2.8 |
| Plasma nach 2. G-CSF-Gabe | 13 | 0.4 \pm 0.8 | 14 | 0.8 \pm 0.7 | 11 | 2.0 \pm 4.7 |
| Plasma nach 3. G-CSF-Gabe | 8 | 0.5 \pm 0.5 | 8 | 0.7 \pm 0.9 | 6 | 0.1 \pm 0.3 |
| Plasma nach 4. G-CSF-Gabe | 4 | 0.5 \pm 0.6 | 5 | 0.4 \pm 0.8 | 4 | 0.5 \pm 1.0 |
| Überstand 1. Konzentrat | 6 | 0.0 \pm 0.0 | 6 | 0.8 \pm 0.9 | 5 | 0.0 \pm 0.0 |
| Überstand 2. Konzentrat | 6 | 0.7 \pm 1.7 | 6 | 0.5 \pm 0.8 | 5 | 0.0 \pm 0.0 |
| Überstand 3. Konzentrat | 3 | 0.0 \pm 0.0 | 3 | 0.0 \pm 0.0 | 2 | 0.4 \pm 0.8 |
| Überstand 4. Konzentrat | 2 | 0.0 \pm 0.0 | 2 | 0.2 \pm 0.2 | 3 | 0.0 \pm 0.1 |

Tabelle 3: Zytokine im Plasma der Spender vor und nach G-CSF-Gabe und in Überständen der Konzentrate (MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung)

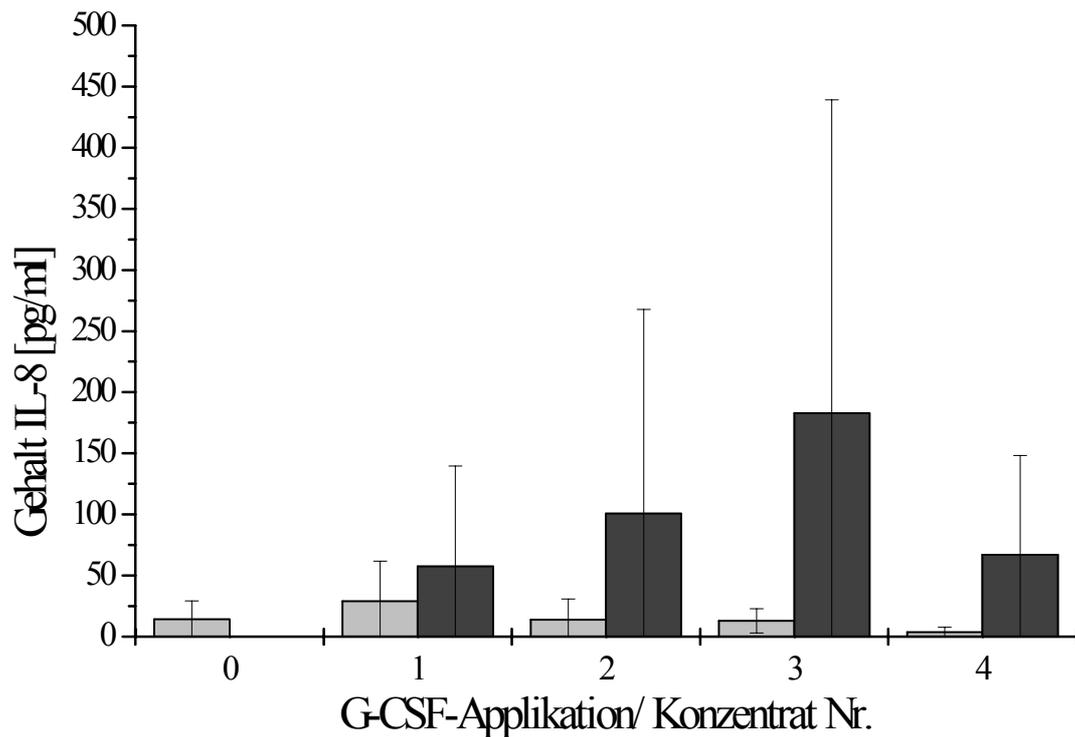


Abb. 7: IL-8-Gehalt in Plasma der Spender vor und nach G-CSF-Applikation und in den Überständen der Konzentrate

3.6 Stimulus-response-coupling (LTB₄-Produktion)

Die Konditionierung der Spender mit G-CSF hatte während der ersten drei Stimulationen keinen Einfluß auf die LTB₄-Produktion der Granulozyten. Nach der vierten G-CSF-Gabe war die produzierte Menge an LTB₄ jedoch signifikant vermindert (Abbildung 8).

Die Produkte eins bis drei lieferten Ergebnisse, die mit der LTB₄-Menge der entsprechenden Messung nach G-CSF-Gabe/vor Apherese vergleichbar waren. Auch im Vergleich zu Granulozyten unstimulierter Spender konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Im vierten Produkt zeigte sich ein unterschiedliches Ergebnis: Hier war die Menge an produziertem LTB₄ sowohl im Vergleich zur vierten G-CSF-Gabe als auch zum unstimulierten Spender signifikant erhöht (Abbildung 8).

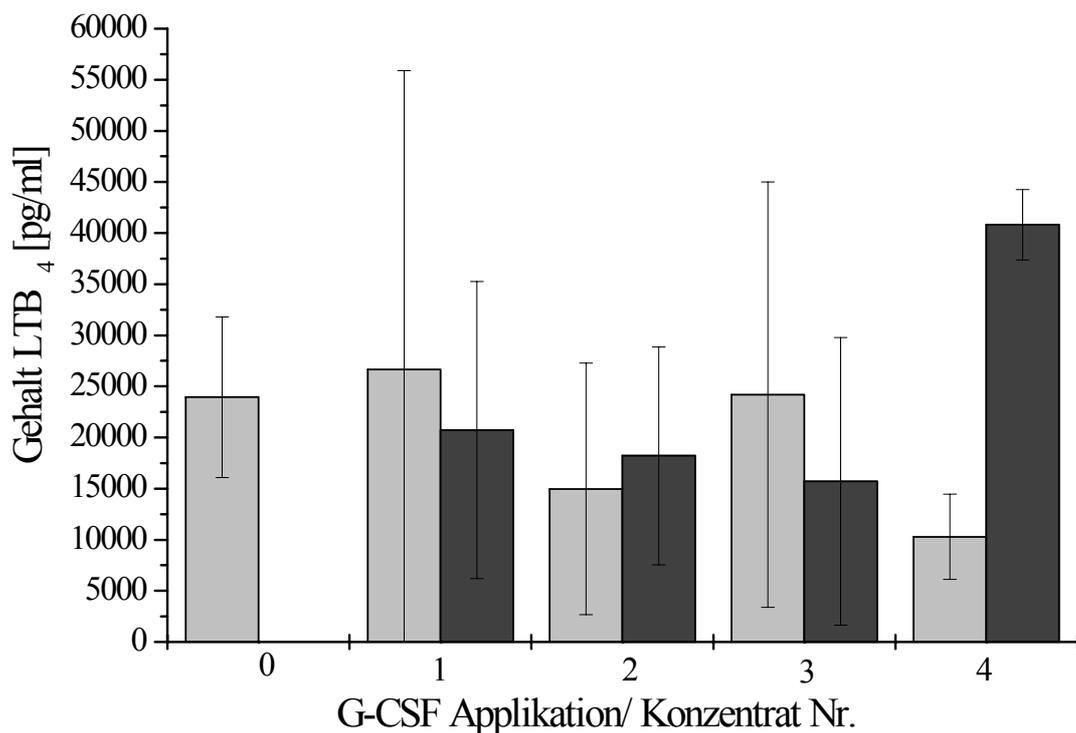


Abb. 8: Stimulus-Response-Coupling (LTB₄-Produktion)

4. Funktionstests bei Empfängern, einfache Auswertung

Da bei Patienten aufgrund ihres Krankheitsbildes nur wenige Granulozyten im peripheren Blut vorhanden waren, konnten nicht alle Funktionstests mit Proben der Empfänger durchgeführt werden. Alle diejenigen Versuche, für die es notwendig war, eine bestimmte Anzahl an Granulozyten aus dem Blut zu isolieren, konnten daher nicht durchgeführt werden. Untersuchungen zur Chemotaxis (Agarosegel-Assay, Boydenkammer-Assay) und zum Stimulus-Response-Coupling (LTB₄-Produktion) wurden aus diesem Grund mit Patientenproben nicht unternommen.

Die Graphiken entsprechen in ihrem Aufbau den Graphiken, die unter Punkt 2) für die Spender und Konzentrate dargestellt sind. „X = 1“ zeigt die Werte nach der ersten Transfusion, „x = 2“ die Werte nach der zweiten Transfusion etc..

Die Patientenproben wurden jeweils acht Stunden nach der Transfusion abgenommen.

Aufgrund der fehlenden Normalverteilung und konstanten Streuung ließ sich eine Varianzanalyse mit Ermittlung statistisch signifikanter Unterschiede nicht durchführen.

4.1 Phagozytose

Da Proben, die den Empfängern abgenommen wurden, nur wenige Granulozyten enthielten, mußten die Proben zur Messung der Phagozytose nicht verdünnt werden.

4.1.1 Phagozytose FITC-markierter E.coli

Die Zahl der phagozytierenden Zellen im Empfängerblut entsprach nach Vergleich mit den Werten der Spender den Ergebnissen nach G-CSF-Gabe (Abb. 9). Das heißt, die Zahl der phagozytierenden Granulozyten, die im Blut des Empfängers detektiert wurden, entsprach der Zahl der phagozytierenden Granulozyten im Blut der Spender, die mit Neupogen[®] konditioniert worden waren. Dies galt sowohl für Spenderproben, die mit PBS verdünnt worden waren, als auch für Spenderproben, die mit Medium verdünnt worden waren (vgl. Abb. 2a und b).

Die Phagozytoserate der Zellen aus der Patientenprobe lag bei deutlich höheren Werten als in Konzentraten, die mit PBS verdünnt worden waren (vgl. Abb. 2a). Auch die Konzentrate, die mit Medium verdünnt worden waren, schnitten schlechter ab als die Granulozyten aus den Patientenproben, wenngleich der Unterschied hier nicht mehr so gravierend war (vgl. Abb. 2b).

Die Patientenproben zeigen von der ersten bis zur vierten Transfusion annähernd gleichbleibende Ergebnisse.

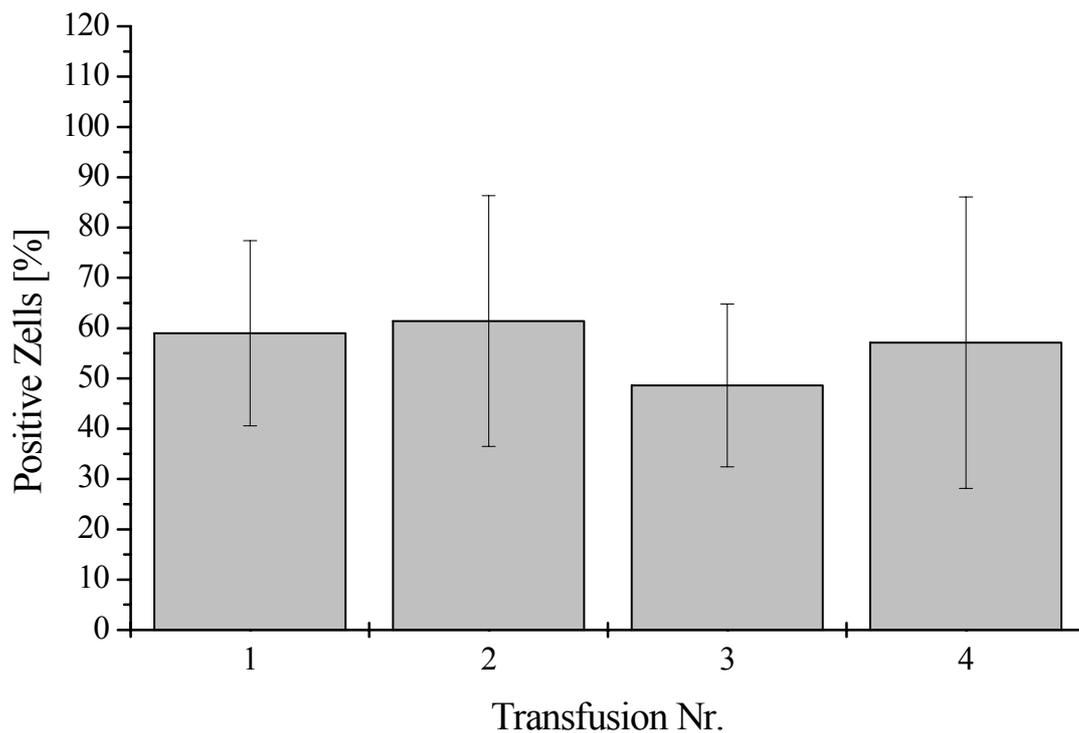


Abbildung 9: Phagozytose FITC-markierter *E.coli*, prozentualer Anteil der phagozytierenden Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl; Proben der Empfänger 8 Stunden nach Transfusion

4.1.2 Phagozytose FITC-markierter Conidien von *Aspergillus fumigatus*

Die Granulozyten im Blut der Empfänger phagozytierten FITC-markierte Conidien ebenso gut wie die Zellen der mit Neupogen® konditionierten Spender und wie die Konzentrate (Abb. 10). Im Vergleich mit den Spenderwerten und den Werten aus den Produkten konnten vergleichbare Ergebnisse detektiert werden (vgl. Abb. 3).

Vergleich man die Patientendaten mit den Ergebnissen unstimulierter Spender, so phagozytierten mehr Zellen aus dem Empfängerblut Conidien als Zellen aus dem Blut der unbehandelten Spender (vgl. Abb. 3). Auch hier zeigte sich keine Verschlechterung oder Verbesserung der Ergebnisse von der ersten bis zur vierten Transfusion.

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, dass die Werte nach der 2. und der 3. Transfusion von jeweils einem einzigen Patienten stammen.

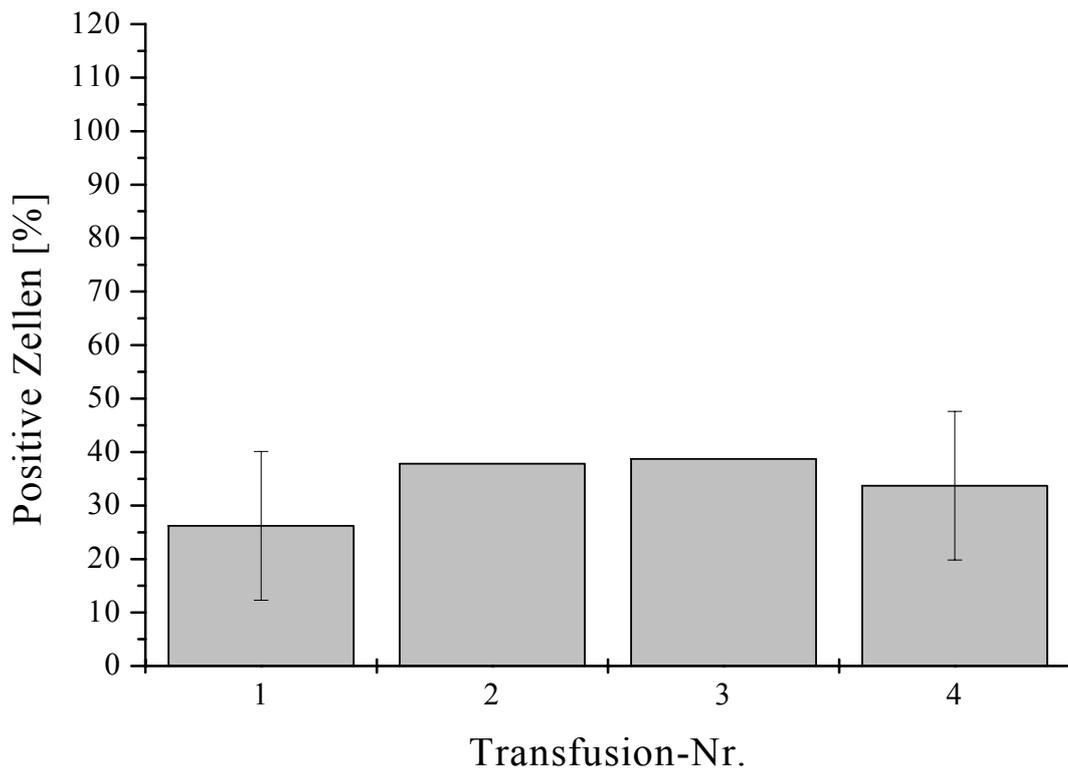


Abb. 10 Phagozytose FITC-markierter Conidien von *Aspergillus fumigatus*, prozentualer Anteil der phagozytierenden Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl; Proben der Empfänger 8 Stunden nach Transfusion

4.2 Oxidativer Burst

Auch in dieser Versuchsreihe mußten die Proben aufgrund der geringen Zellzahlen nicht verdünnt werden.

4.2.1 Stimulation mit E.coli

Granulozyten im Patientenblut, das 8 Stunden nach Transfusion entnommen wurde, produzierten nach *E.coli*-Stimulation in einem Maß reaktive Sauerstoffspezies, das mit demjenigen Medium-verdünnter Konzentrate vergleichbar war (Abb. 11; vgl. Abb. 4b). Ebenso wie bei den Konzentraten konnte eine Tendenz gezeigt werden, dass die Burstaktivität von der ersten zur vierten Transfusion abnahm.

Die Daten aus dem Empfängerblut lagen knapp unter den Werten der Neupogen®-behandelten Spender, deren Proben mit PBS verdünnt worden waren (vgl. Abb. 4a) und etwas deutlicher unter den Werten der mit Medium verdünnten Proben Neupogen®-behandelter Spender (vgl. Abb. 2.4b).

Die Ergebnisse aus den Patientenproben lagen im Vergleich mit unstimulierten Spendern (vor Neupogen®-Gabe) nach den ersten beiden Transfusionen etwa gleich (vgl. Abb. 4a) bis leicht darüber (vgl. Abb. 4b), nach der dritten und vierten Transfusion etwas darunter (vgl. Abb. 4a und b).

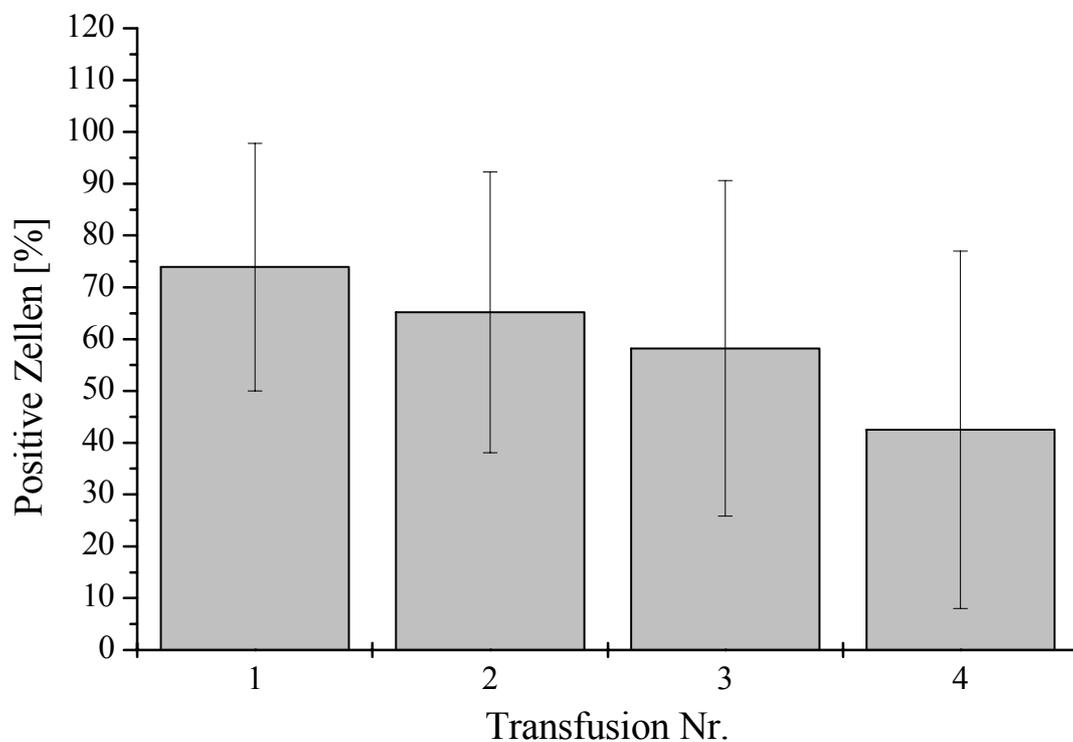


Abb. 11 Oxidativer Burst nach Stimulation mit *E.coli*, prozentualer Anteil der Radikale produzierenden Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl; Proben der Empfänger 8 Stunden nach Transfusion

4.2.2 Stimulation mit f-MLP

Nach f-MLP-Stimulation produzierten weniger Granulozyten aus Patientenproben Sauerstoffradikale als Granulozyten aus Spendervollblut nach G-CSF-Gabe oder in Konzentraten (Abb. 12, vgl. Abb. 5a und b). Dies war sowohl bei PBS als auch bei Medium verdünnten Spenderproben nach G-CSF als auch bei den entsprechenden Konzentraten der Fall.

Die im Patienten detektierten Ergebnisse ließen sich aber mit den Ergebnissen unstimulierter Spender vergleichen (vgl. Abb. 5a und b).

Innerhalb der Meßreihe von der ersten bis zur vierten Transfusion lagen die Ergebnisse annähernd gleich, lediglich nach der zweiten Transfusion produzierten mehr Zellen Sauerstoffradikale als bei den übrigen Transfusionen (Ergebnisse nicht signifikant).

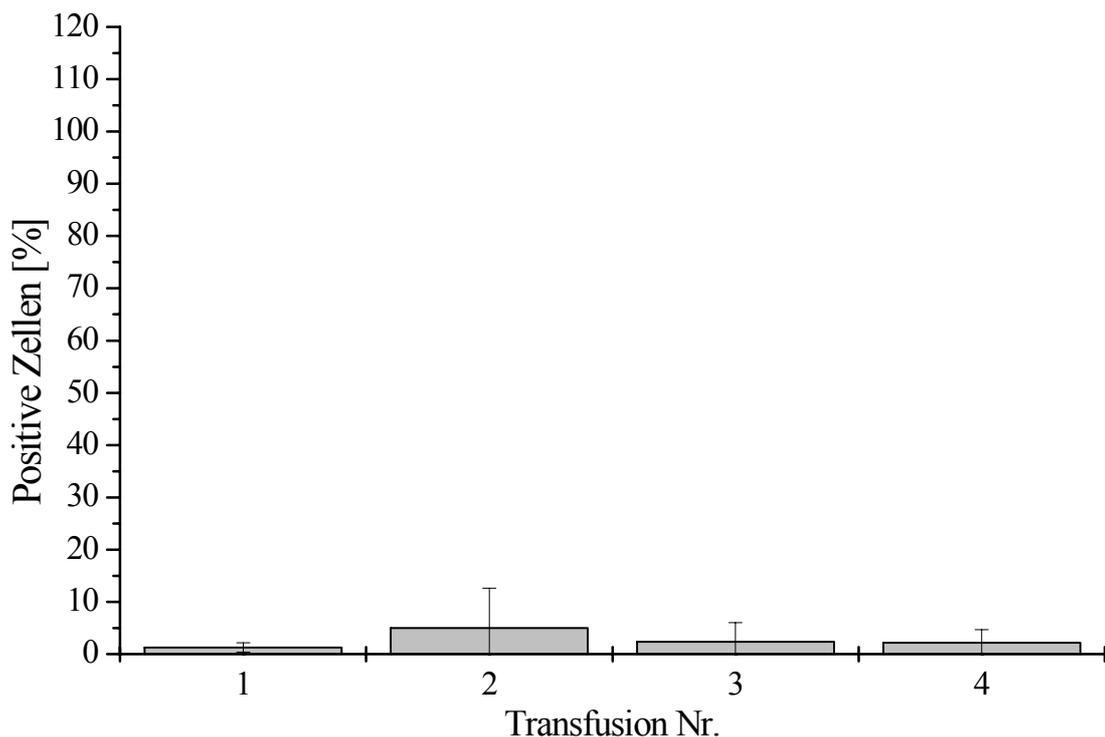


Abb. 12 Oxidativer Burst nach Stimulation mit f-MLP, prozentualer Anteil der Radikale produzierenden Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl; Proben der Empfänger 8 Stunden nach Transfusion

4.3 Oberflächenantigene, Aktivierungsmarker

Die Expression der untersuchten Oberflächenmarker fiel bei Granulozyten aus Patientenblut wieder auf bzw. unter das Level von Zellen nach G-CSF-Gabe zurück (Abbildung 13; vgl. Abb. 6a bis d). Das bedeutet, dass die in den Produkte zunächst starke Hochregulation v.a. von CD11a, CD62L und CD64 in den Patienten nicht bestätigt werden konnte. Die Expression ging wieder zurück.

Die Ergebnisse der Oberflächenmarker nach der dritten und vierten Transfusion, die in der Graphik erhöht schienen, müssen vorsichtig interpretiert werden, da die Daten von nur jeweils einem Patienten zur Verfügung standen.

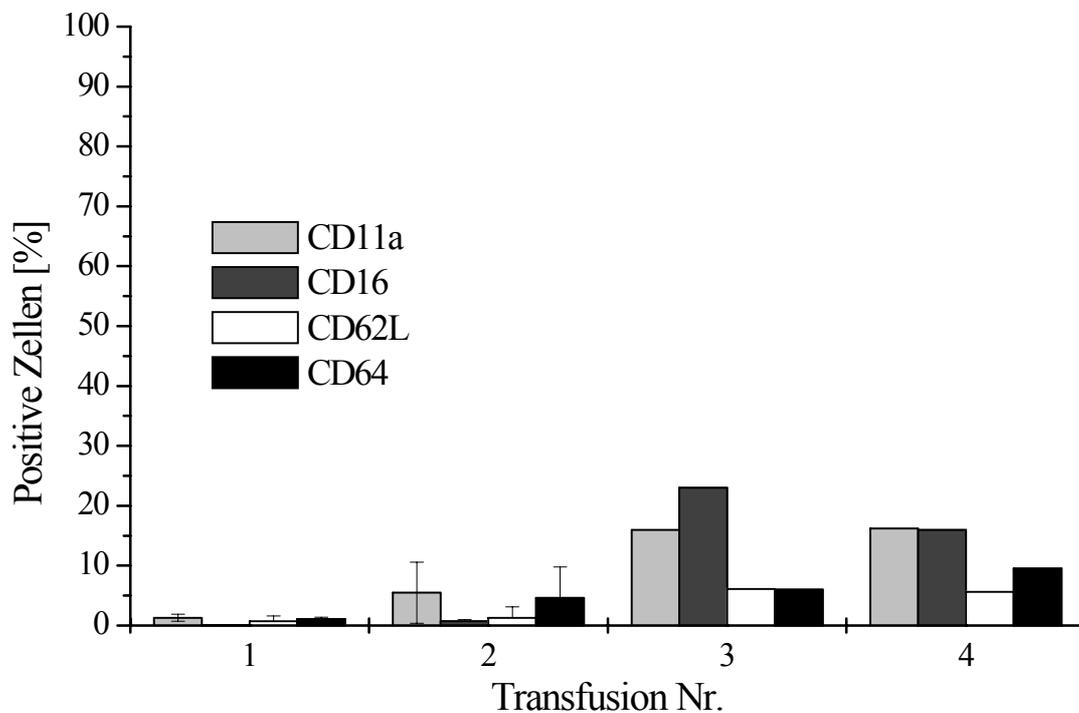


Abb. 13 Expression von Oberflächenantigenen, prozentualer Anteil der Antigen-positiven Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl; Proben der Empfänger 8 Stunden nach Transfusion

5. Funktionstests in Spendern und Konzentraten, paarweiser Vergleich

In einer zweiten Auswertung wurden die Ergebnisse aus den verschiedenen Funktionstests paarweise miteinander verglichen. Dazu diente die Jump[®]-Statistik-Software.

Bei dieser Vorgehensweise wurde jeder Spender zunächst einzeln betrachtet. Die Werte eines Spenders, die nach seiner Stimulation mit G-CSF ermittelt worden waren, wurden einzeln mit dem Wert vor G-CSF-Applikation desselben Spenders verglichen. Dazu wurde der Wert vor G-CSF-Gabe vom Wert der ersten bis vierten G-CSF-Gabe subtrahiert. Nach diesen Einzelauswertungen wurden erneut aus allen Spendern Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet.

Zur Auswertung der Konzentrate wurde analog verfahren: Jedes von einem Spender gewonnene Granulozytenpräparat wurde mit dem entsprechenden Wert desselben Spenders nach der zugehörigen G-CSF-Gabe verglichen. D.h., das erste Konzentrat eines Spenders A mit der ersten G-CSF-Gabe des Spenders A. Hier wurde vom Ergebnis aus dem Präparat das Ergebnis der entsprechenden G-CSF-Stimulation subtrahiert. Nach allen Einzelauswertungen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen über alle Präparate gebildet.

Der Aufbau der Graphiken entspricht prinzipiell dem der Graphiken in der einfachen Auswertung. „X = 1“ bedeutet erste G-CSF-Gabe verglichen mit Wert vor G-CSF bzw. erstes Präparat verglichen mit erster G-CSF-Gabe etc. Werte im negativen Bereich verdeutlichen, dass die Zellen in ihrer Funktion nachgelassen haben. Liegt z.B. ein Wert für den paarweisen Vergleich nach der ersten G-CSF-Stimulation im Negativen, so bedeutet dies, dass die Zellen in diesem Funktionstest nach der ersten G-CSF-Applikation schlechter waren als vor G-CSF-Gabe, da der Wert vor G-CSF stets subtrahiert wird. Analoges gilt für die Konzentrate: Negative Werte verdeutlichen, dass die Produkte schlechter waren als die zugehörigen Proben nach der G-CSF-Stimulation.

Mittels t-Test wurde die statistische Relevanz der Daten überprüft. Als signifikant galten danach Messergebnisse mit einem p-Wert kleiner/gleich 0,05 ($p \leq 0,05$).

5.1 Chemotaxis

5.1.1 Wanderung unter Agarose

Auch in dieser Auswertung konnte kein durchgehend signifikanter Einfluß der G-CSF-Applikation und/ oder der Apherese auf die Wanderstrecke der Granulozyten festgestellt werden. Die Graphik (Abb. 14a) zeigt eine leicht verminderte Wanderstrecke der G-CSF-stimulierten Spenderzellen (hellgraue Balken) nach der ersten, zweiten und vierten Stimulation (Werte negativ), aber lediglich die Ergebnisse nach der zweiten G-CSF-Applikation waren signifikant ($p = 0,04$). Im Fall der dritten Stimulation konnte sogar eine Verlängerung der Wanderstrecke detektiert werden, aufgrund der hohen Standardabweichung erreichte dieses Ergebnis aber keine statistische Signifikanz.

Die Produkte verhielten sich umgekehrt: das erste, zweite und vierte Produkt waren nach paarweisem Vergleich mit der korrespondierenden G-CSF-Stimulation jeweils weiter gewandert als die Zellen aus Vollblut nach G-CSF-Gabe (positive Werte). Beim dritten Produkt war die Wanderstrecke der Granulozyten aus Vollblut nach der dritten G-CSF-Gabe größer als im dritten Produkt (negativer Wert). Da auch hier große Standardabweichungen auftraten, waren die Ergebnisse nicht signifikant.

Insgesamt gesehen hoben sich die einzelnen Effekte also wieder auf: Waren die Ergebnisse nach G-CSF-Gabe zunächst schlechter als in unstimulierten Spendern, so zeigten die Produkte im Vergleich zur G-CSF-Stimulation aber wieder bessere Werte.

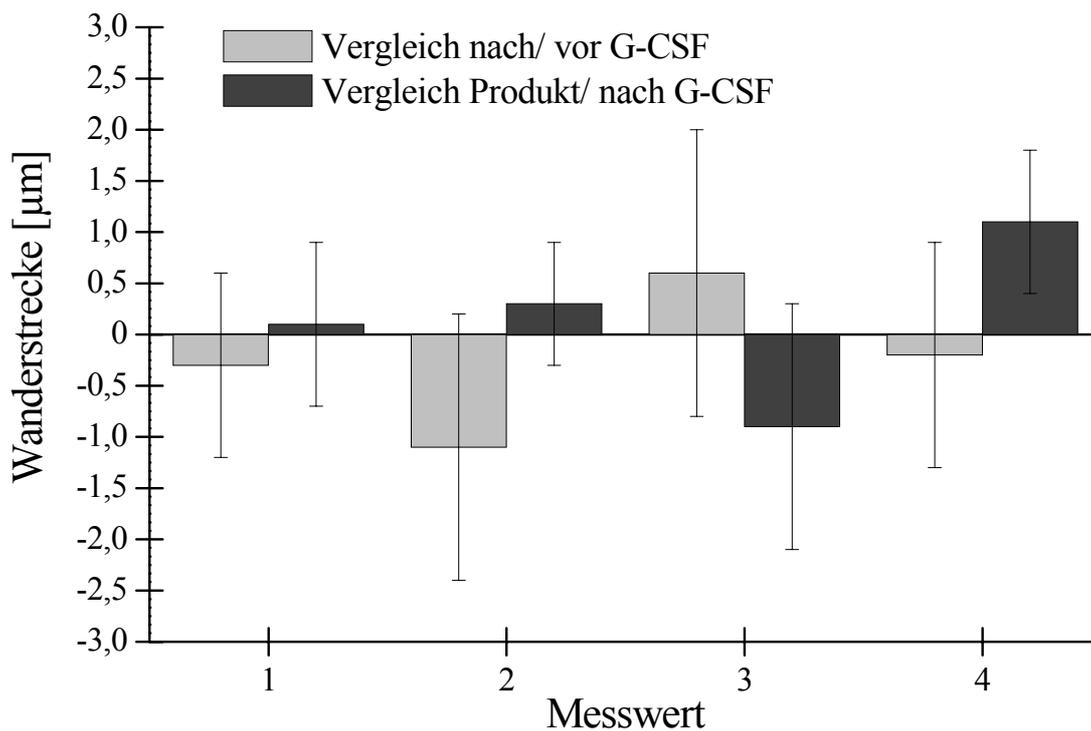


Abb. 14a Chemotaxis- Wanderung unter Agarose: Wanderstrecke [μm] der Granulozyten als Differenz zwischen spontaner und induzierter Migration

5.1.2 Boydenkammer-Assay

Auch im Boydenkammer-Assay konnte kein statistisch signifikanter Einfluß der G-CSF-Stimulation und/ oder der Apherese auf die Funktion der Granulozyten festgestellt werden (Abbildung 14b).

Betrachtete man zunächst den Vergleich zwischen unstimulierten Spendern und Werten nach G-CSF-Gabe, so konnte nach der ersten Stimulation eine leichte Erhöhung der Anzahl wandernder Zellen, nach der zweiten und dritten Stimulation aber ein Abfall der Anzahl wandernder Granulozyten detektiert werden (negative Werte). Ein paarweiser Vergleich zwischen vierter Stimulation und unstimulierten Spendern war aufgrund fehlender Daten nicht möglich. Dies bedeutete, dass die Anzahl der wandernden Zellen ab der zweiten G-CSF-Gabe geringer wurde, die wiederholte G-CSF-Stimulation des Spenders die Zellen also negativ beeinflusste.

Aufgrund hoher Standardabweichungen waren diese Ergebnisse aber nicht statistisch signifikant.

Im Vergleich der Produkte mit den zugehörigen Werten der stimulierten Spender wanderten weniger Zellen aus den Produkten durch die Filterporen auf den chemotaktischen Stimulus zu als Granulozyten aus Vollblut G-CSF-stimulierter Spender (negative Werte). Doch auch diese Ergebnisse waren nicht signifikant.

Bei Meßwert 1 war die Zahl der gewanderten Zellen nach G-CSF zunächst etwas erhöht (positiver Wert), der Effekt hob sich dann aber wieder auf, da die Produkte im Vergleich zu diesem Wert schlechter lagen. Bei Meßwert 2 und 3 waren die Werte bereits in den Proben nach G-CSF schlechter als in unstimulierten Spendern (negative Werte). Diese negative Tendenz setzte sich weiter in den Produkten fort, dort waren die Werte noch einmal schlechter als in den Proben nach G-CSF (negative Werte), wenn auch der Unterschied nicht mehr so deutlich war.

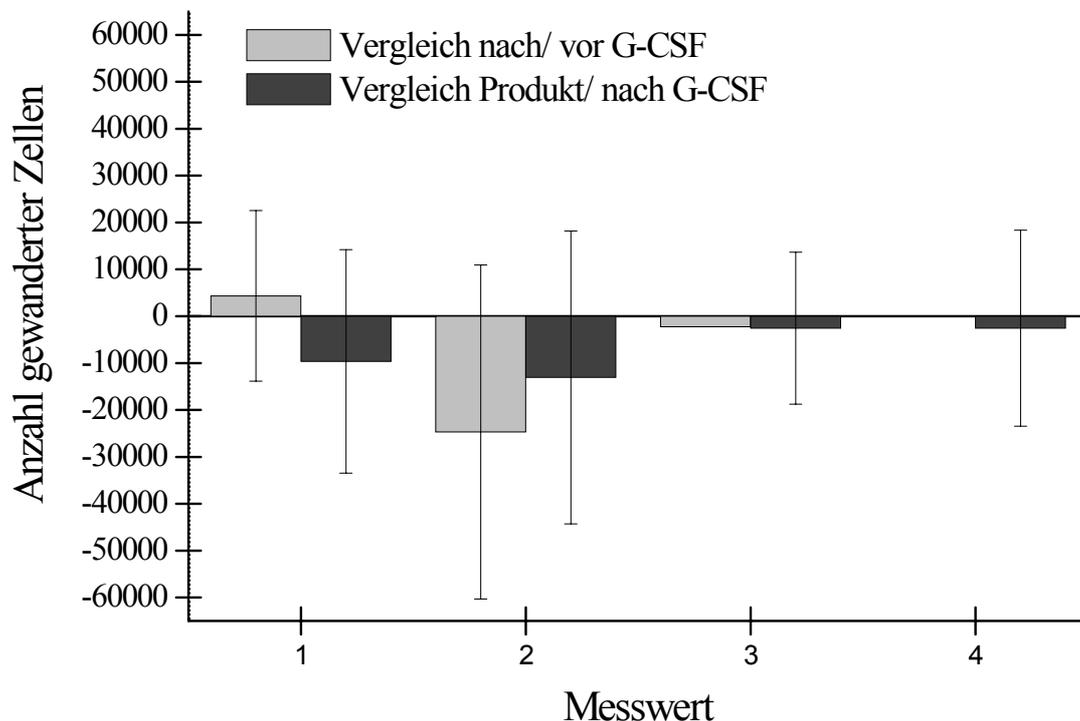


Abb. 14b Chemotaxis-Boydenkammer-Assay: Anzahl der durch Filterporen gewanderten Zellen als Differenz zwischen spontaner und induzierter Migration

5.2 Phagozytose

5.2.1 Phagozytose FITC-markierter E.coli

Wie schon unter Punkt 2/ einfache Auswertung beschrieben, wurden die Proben nach G-CSF-Gabe und die Konzentrate für den Phagozytostest zunächst mit PBS verdünnt (Abbildung 15a).

Die Phagozytoseaktivität der Granulozyten wurde bei PBS-verdünnten Proben durch die Stimulation der Spender mit Neupogen[®] leicht vermindert. Dabei war die verminderte Phagozytoseleistung lediglich nach der zweiten G-CSF-Gabe statistisch signifikant ($p = 0,05$). Nach der dritten Stimulation phagozytierten mehr Granulozyten aus Proben nach der Stimulation als Zellen vor G-CSF-Applikation (nicht signifikant).

Die Produkte zeigten mit Ausnahme der vierten Konzentrate im paarweisen Vergleich mit der ihnen entsprechenden G-CSF-Stimulation eine signifikant schlechtere Phagozytoseleistung (Meßwert 1: $p = 0,0001$; Meßwert 2: $p = 0,0002$; Meßwert 3: $p = 0,0003$).

Das bedeutet, dass die Zellen durch die Neupogen[®]-Gabe geschädigt schienen, und auch die Apherese einen zusätzlichen negativen Einfluß auf die Phagozytose FITC-markierter *E.coli* hatte.

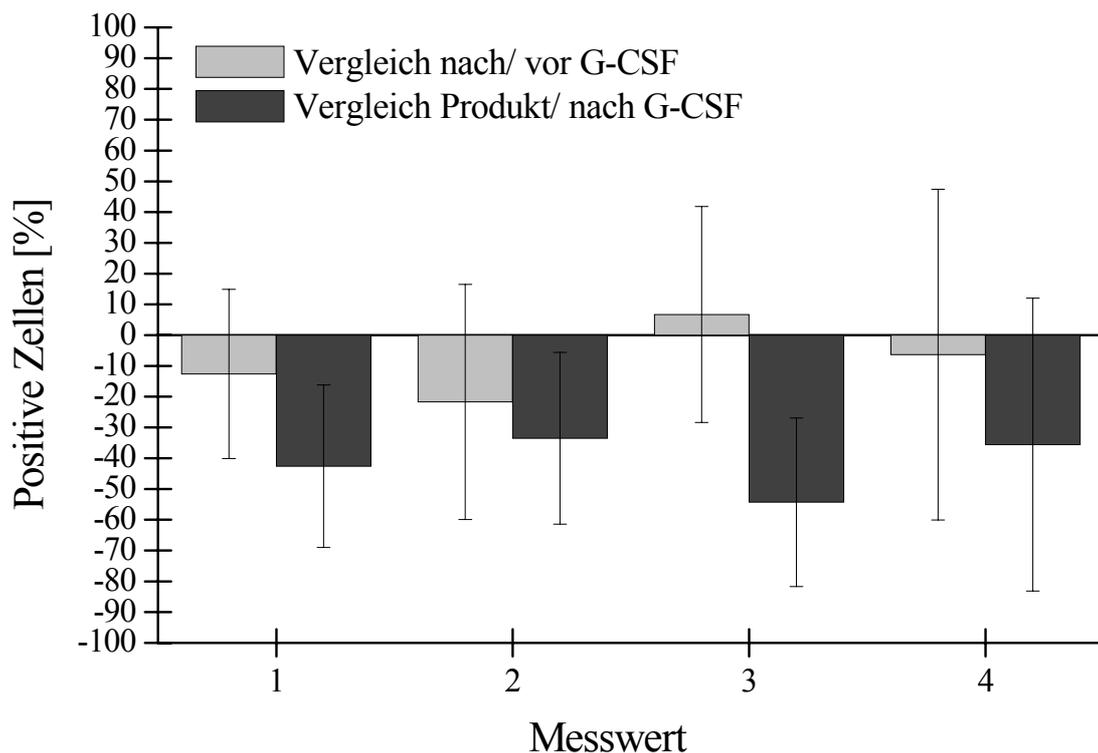


Abb. 15a Phagozytose FITC-markierter *E.coli*, prozentualer Anteil phagozytischer Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl; Verdünnung der Proben mit PBS

Nach dieser Versuchsreihe wurden ebenfalls die mit Medium verdünnten Proben einem paarweisen Vergleich unterzogen und so noch einmal ausgewertet (Abbildung 15b):

Die Graphik zeigt, dass die Granulozyten nach G-CSF-Stimulation der Spender eine höhere Phagozytoserate zeigten als Zellen unstimulierter Spender. Im paarweisen Vergleich lagen die Zellen aus Proben nach G-CSF bei besseren Werten (positive Werte). Eine Ausnahme bildete die dritte G-CSF-Applikation, hier schnitten die stimulierten Granulozyten schlechter ab als unstimulierte Zellen, hier trat aber auch eine sehr hohe Standardabweichung auf.

In allen Produkten wurde eine schlechtere Phagozytoseleistung als in Proben der stimulierten Spender detektiert (negative Werte).

Damit schien die G-CSF-Gabe einen leicht positiven und die Apherese einen negativen Einfluß auf die Phagozytoseleistung der Zellen zu besitzen. Summa summarum hoben sich diese Effekte also wieder auf, so dass die Zellen annähernd die Leistung der Zellen aus unstimulier-

mulierten Spender erreichen sollten. Nur das vierte Produkt war sehr viel schlechter als der Wert nach G-CSF-Gabe.

Statistische Signifikanz erreichten im Vergleich der Produkte mit der entsprechenden G-CSF-Stimulation die Meßwerte eins, drei und vier. Im beidseitigen t-Test wurden hier p-Werte von 0,002 (Meßwert 1), 0,02 (Meßwert 3) und 0,01 (Meßwert 4) ermittelt.

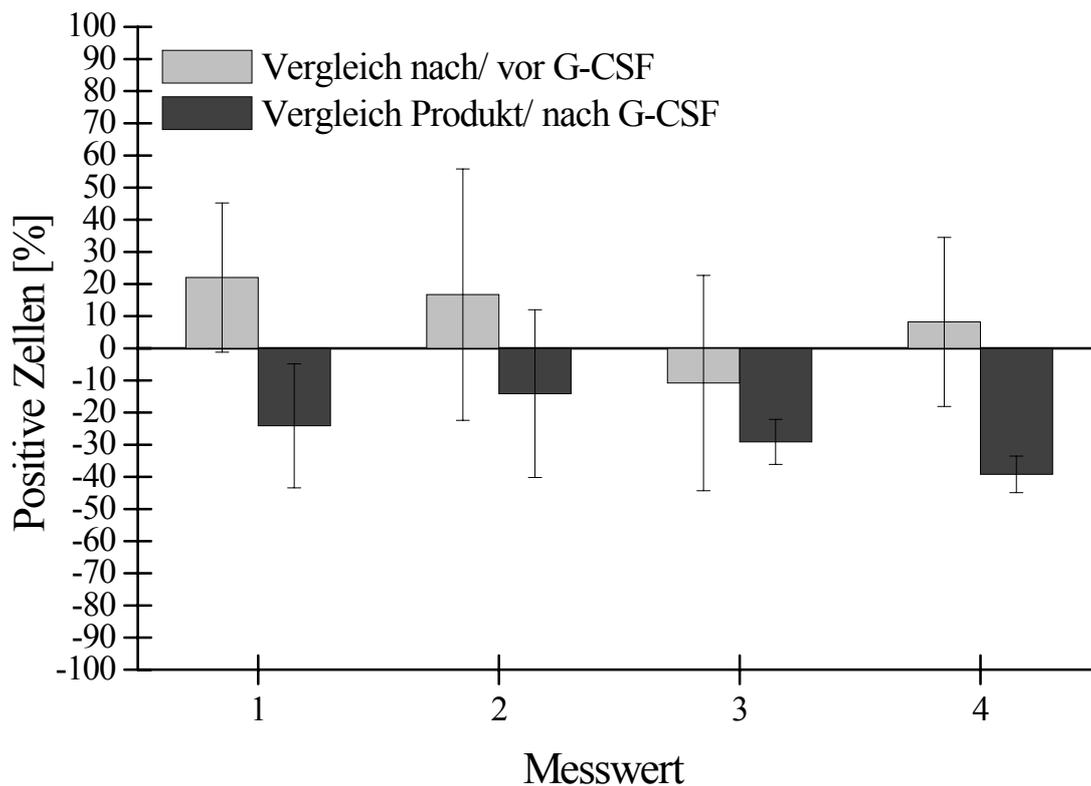


Abb. 15b Phagozytose FITC-markierter *E.coli*, prozentualer Anteil phagozytischer Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl; Verdünnung der Proben mit Medium

5.2.2 Phagozytose FITC-markierter Conidien von *Aspergillus fumigatus*

Im paarweisen Vergleich der Proben nach G-CSF mit den Proben vor G-CSF konnte kein Einfluß der Neupogen®-Stimulation auf die Phagozytose FITC-markierter Conidien festgestellt werden (Abbildung 16). Die leicht erhöhten Werte nach G-CSF-Gabe besaßen keine statistische Signifikanz.

Auch die Produkte zeigten im Vergleich mit den entsprechenden G-CSF-Stimulationen keine signifikante Veränderung, die durch die Apherese zu erklären wäre.

Bei Meßwert drei war aufgrund fehlender Daten kein Vergleich zwischen Produkt und G-CSF-Gabe möglich.

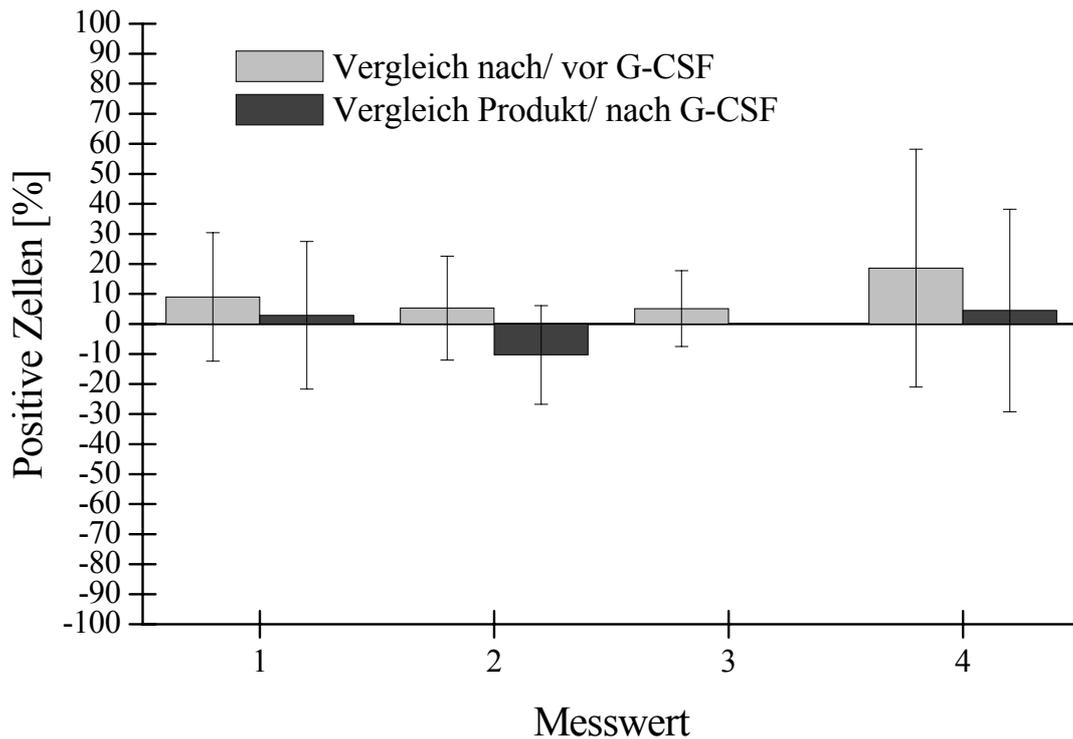


Abb. 16 Phagozytose FITC-markierter Conidien von *Aspergillus fumigatus*: prozentualer Anteil phagozytierender Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl;

5.3 Oxidativer Burst

Zur Untersuchung des respiratorischen Bursts wurden die Proben nach G-CSF-Gabe und die Konzentrate wie unter Punkt 2/ einfache Auswertung beschrieben zunächst mit PBS, in einer zweiten Versuchsreihe mit Medium verdünnt.

5.3.1 Stimulation mit E.coli

Nach Stimulation mit E.coli zeigten PBS-verdünnte Proben nach G-CSF eine leicht verminderte Fähigkeit, reaktive Sauerstoffspezies zu produzieren. Lediglich nach der vierten Stimulation war aber das Ergebnis statistisch signifikant ($p = 0,01$). Die Produkte verhielten sich ähnlich: Auch die Werte der Produkte waren im Vergleich zur zugehörigen G-CSF-Stimulation schlechter (Abbildung 17a), nur das vierte Produkt stellte eine Ausnahme dar. Im Vergleich der Produkte eins bis drei mit den entsprechenden G-CSF-Stimulationen der Spender konnte eine signifikante Abnahme der Radikalproduktion detektiert werden (Meßwert 1: $p = 0,0001$; Meßwert 2: $p = 0,0003$; Meßwert 3: $p = 0,0003$). Das bedeutete eine weitere Verschlechterung der Ergebnisse in den Produkten. Die Zellen wurden zunächst durch die G-CSF-Gabe negativ beeinflusst, die Fähigkeit, Sauerstoffradikale zu bilden, ließ nach. Durch die Apherese schien diese Fähigkeit noch weiter vermindert zu werden, da die Produkte im Vergleich zu den Proben nach G-CSF ebenfalls schlechtere Ergebnisse lieferten. Aufgrund der hohen Standardabweichungen müssen diese Ergebnisse jedoch vorsichtig interpretiert werden.

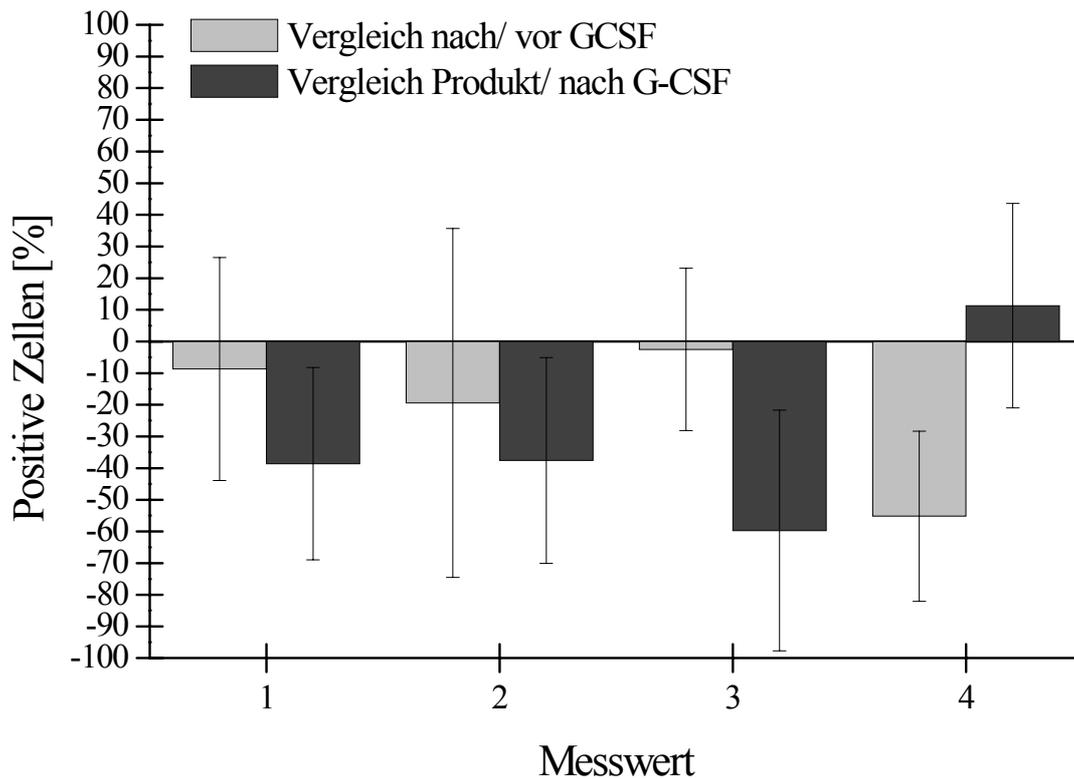


Abb. 17a Oxidativer Burst nach Stimulation mit E.coli: prozentualer Anteil Radikale produzierender Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl; Verdünnung der Proben mit PBS

Betrachtete man die Ergebnisse aus Medium-verdünnten Proben nach paarweisem Vergleich, so zeigte sich ein anderes Bild (Abbildung 17b).

Die Granulozyten aus Spendern, die mit G-CSF behandelt worden waren, zeigten im Vergleich mit den Werten vor der Neupogen[®]-Gabe verbesserte Fähigkeiten, reaktive Sauerstoffverbindungen zu bilden (positive Werte). Statistische Signifikanz erreichte jedoch nur das Resultat bei Meßwert eins ($p = 0,03$).

Dagegen lagen die Zellen aus den Produkten im Vergleich mit Werten der entsprechenden G-CSF-Gabe im negativen Bereich, waren also schlechter. Von Relevanz waren dabei die statistisch signifikanten Ergebnisse bei Meßwert eins ($p = 0,05$), zwei ($p = 0,02$) und vier ($p = 0,01$).

Insgesamt gesehen behielten die Zellen ihre Fähigkeit zum oxidativen Burst also nahezu bei, da die verbesserten Werte nach Neupogen[®]-Gabe durch die Verschlechterung in den Produkten wieder aufgehoben wurde. Auch hier fallen die Standardabweichungen sehr groß aus.

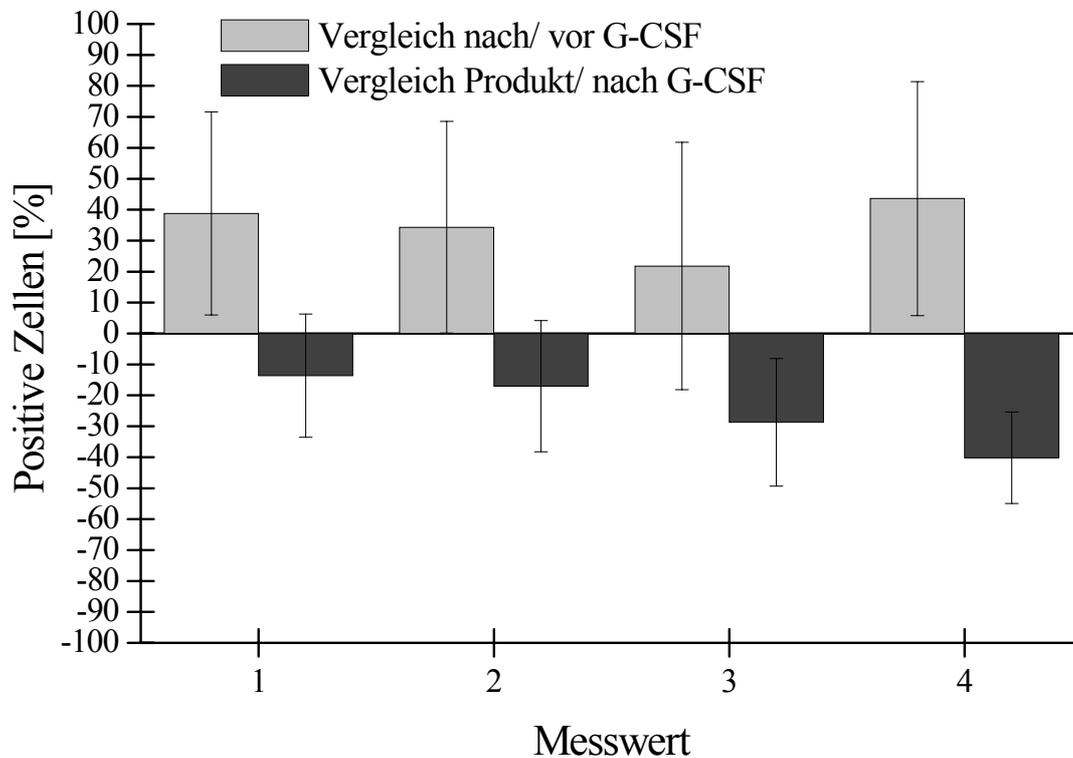


Abb. 17b Oxidativer Burst nach Stimulation mit *E.coli*: prozentualer Anteil Radikale produzierender Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl; Verdünnung der Proben mit Medium

5.3.2 Stimulation mit *f*-MLP

Nach Verdünnung mit PBS zeigten die Proben nach G-CSF eine leichte Erhöhung des respiratorischen Bursts nach Stimulation mit *f*-MLP (Abbildung 18a). Die Produkte dagegen zeigten bis auf Konzentrat Nr. 4 alle ein negatives Ergebnis (Abbildung 18a). D.h., in den Konzentraten produzierten weniger Granulozyten reaktive Sauerstoffspezies als in den Spenderproben nach der entsprechenden G-CSF-Gabe. Lediglich die Zellen aus dem vierten Konzentrat generierten mehr Sauerstoffradikale als die Zellen aus der zugehörigen Probe nach G-CSF-Gabe.

Aufgrund der hohen Standardabweichungen ergab nur der Vergleich der zweiten G-CSF-Gabe mit unstimulierten Spendern eine signifikante Erhöhung der Radikalproduktion ($p = 0,05$).

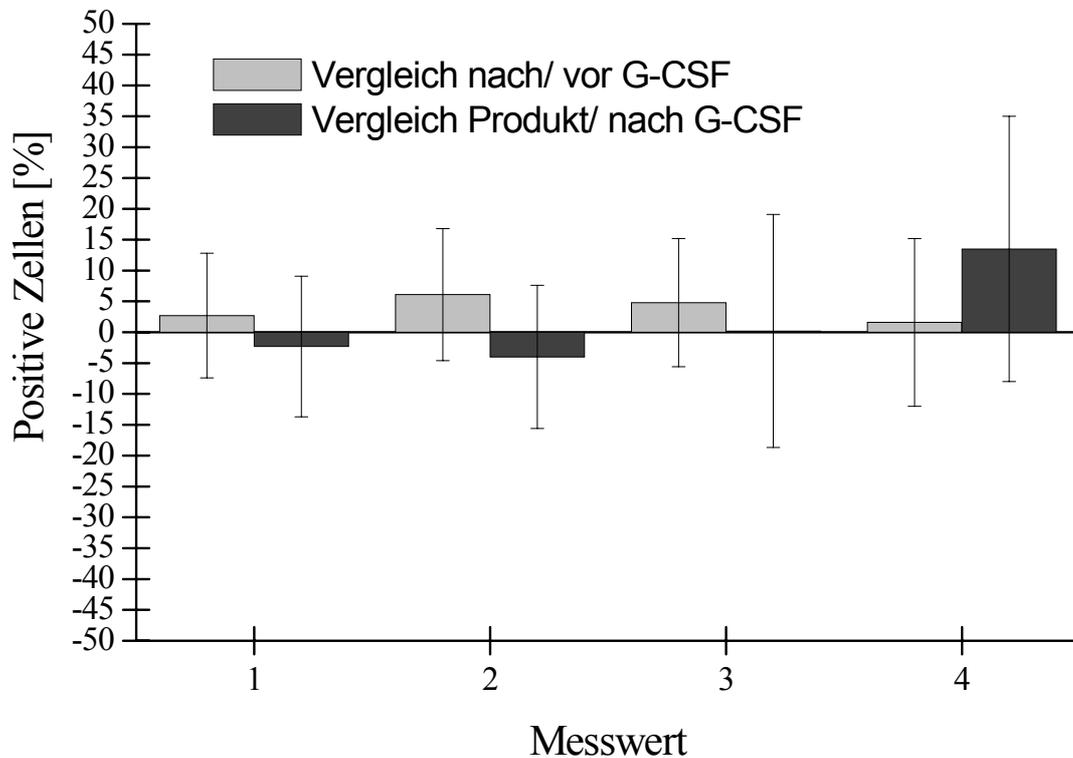


Abb. 18a Oxidativer Burst nach Stimulation mit f-MLP: prozentualer Anteil Radikale produzierender Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl; Verdünnung der Proben mit PBS

Verdünnte man die Proben nach G-CSF und die Konzentrate mit Medium, so zeigte sich, dass in den Proben nach der ersten G-CSF-Gabe zunächst weniger Zellen Radikale bildeten als in den unstimulierten Proben (Abbildung 18b, Meßwert 1, hellgrauer Balken). Ab der zweiten Applikation hatte die G-CSF-Gabe aber einen positiven Einfluß auf die Sauerstoffradikalproduktion (Abbildung 18b). Die Produkte waren im Vergleich mit der entsprechenden Neupogen®-Stimulation zunächst etwas besser (Abbildung 18b, Meßwerte 1 und 2, dunkelgraue Balken), danach aber schlechter (Abbildung 18b, Meßwerte 3 und 4, dunkelgraue Balken). Insgesamt gesehen hatten weder die G-CSF-Gabe noch die Apherese einen statistisch signifikanten Einfluß auf die Fähigkeit der Zellen, Sauerstoffradikale zu bilden.

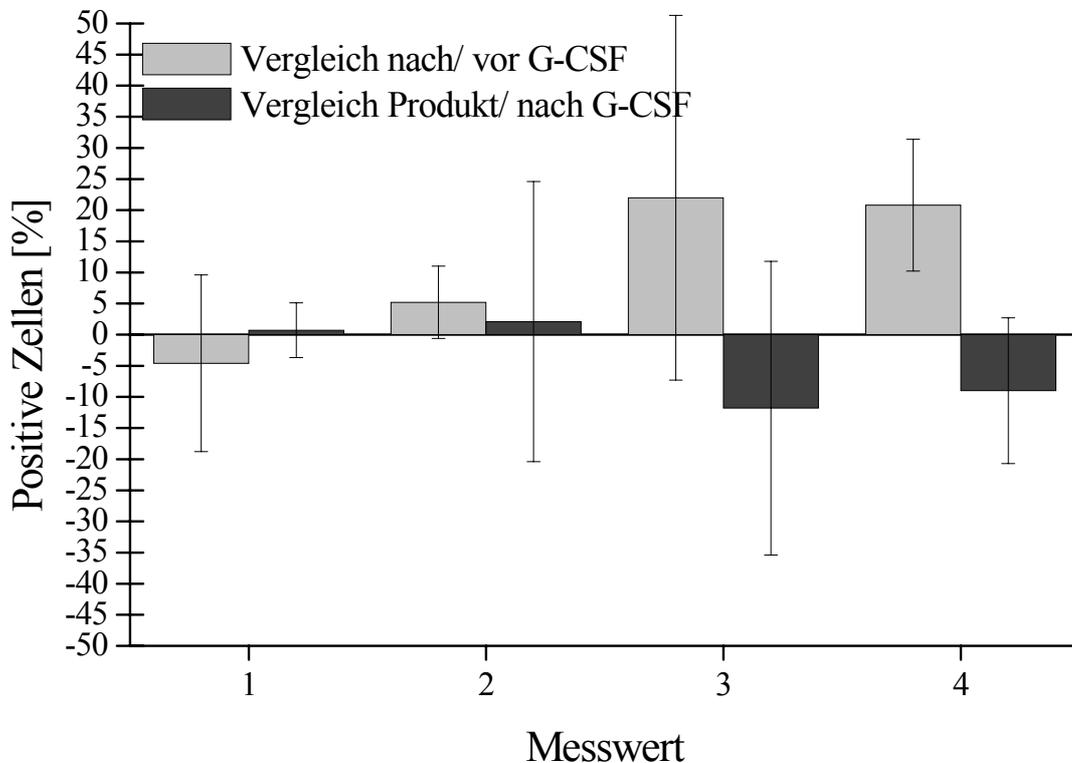


Abb. 18b Oxidativer Burst nach Stimulation mit f-MLP: prozentualer Anteil Radikale produzierender Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl; Verdünnung der Proben mit Medium

5.4 Oberflächenantigene, Aktivierungsmarker

Betrachtete man die Expression von CD16 (Abbildung 19a) auf Granulozyten nach G-CSF-Applikation im Vergleich mit der Expression vor G-CSF-Gabe, so war erkennbar, dass CD16 unter G-CSF-Einfluß in den meisten Fällen herunterreguliert wurde. Die Expression dieses Markers war aber nur nach der zweiten G-CSF-Gabe signifikant vermindert ($p = 0,02$). Nach der dritten G-CSF-Stimulation konnte ein leichtes Ansteigen dieses Markers auf der Zelloberfläche detektiert werden (nicht signifikant). Die Bestimmung von CD16 auf den Granulozyten der Produkte ergab dagegen eine mittlere bis starke Hochregulation dieses Markers im Ver-

gleich zur entsprechenden Probe nach G-CSF (Ergebnisse nicht signifikant). Somit hoben sich die beiden Effekte nahezu wieder auf .

CD11a (Abbildung 19b) wurde nach G-CSF-Stimulation der Spender zunächst stark herunterreguliert. Diese Resultate waren mit Ausnahme des vierten Meßwerts alle signifikant (Meßwert 1: $p = 0,002$; Meßwert 2: $p = 0,02$; Meßwert 3: $p = 0,5$). Im Unterschied dazu stieg die Expression dieses Integrins auf der Oberfläche der Granulozyten in den Konzentraten wieder stark an. Die vermehrte Expression von CD11a war beim Vergleich der ersten ($p = 0,01$), zweiten ($p = 0,03$) und dritten ($p = 0,04$) Produkte mit der zugehörigen G-CSF-Stimulation des Spenders statistisch signifikant.

Das L-Selectin CD62L (Abbildung 19c) konnte auf der Oberfläche der Granulozyten aus Spenderblut nach G-CSF-Gabe im Vergleich zum unstimulierten Spender in vermindertem Maß detektiert werden. Seine Expression wurde unter G-CSF-Einfluß verringert. Das Ergebnis war aber nur bei Meßwert 1 signifikant ($p = 0,01$). Auch hier zeigte sich im Produkt das umgekehrte Bild: Im Vergleich mit der zugehörigen Probe nach G-CSF-Applikation exprimierten mehr Granulozyten aus den Konzentraten diesen Marker auf ihrer Oberfläche. Signifikante Resultate wurden dabei beim Vergleich des ersten Produktes mit der ersten G-CSF-Gabe ($p = 0,01$) und beim Vergleich des zweiten Produktes mit der zweiten G-CSF-Gabe ($p = 0,09$) ermittelt.

Auch CD64 (Abbildung 19d) unterlag einem Einfluß von G-CSF-Gabe und Apherese: Auf Proben nach Neupogen[®]-Gabe wurde dieses Antigen zunächst vermindert (Meßwert 1) und dann leicht erhöht gemessen (Ergebnisse nicht statistisch signifikant). Meßwert 4 zeigte zwar wieder eine Herunterregulation nach G-CSF-Applikation, dieses Ergebnis beruht jedoch auf nur einem Wertepaar. In den Produkten stieg die Expression von CD64 im Vergleich zu Zellen nach G-CSF weiter an (Signifikanz nur bei Meßwert 1: $p = 0,02$).

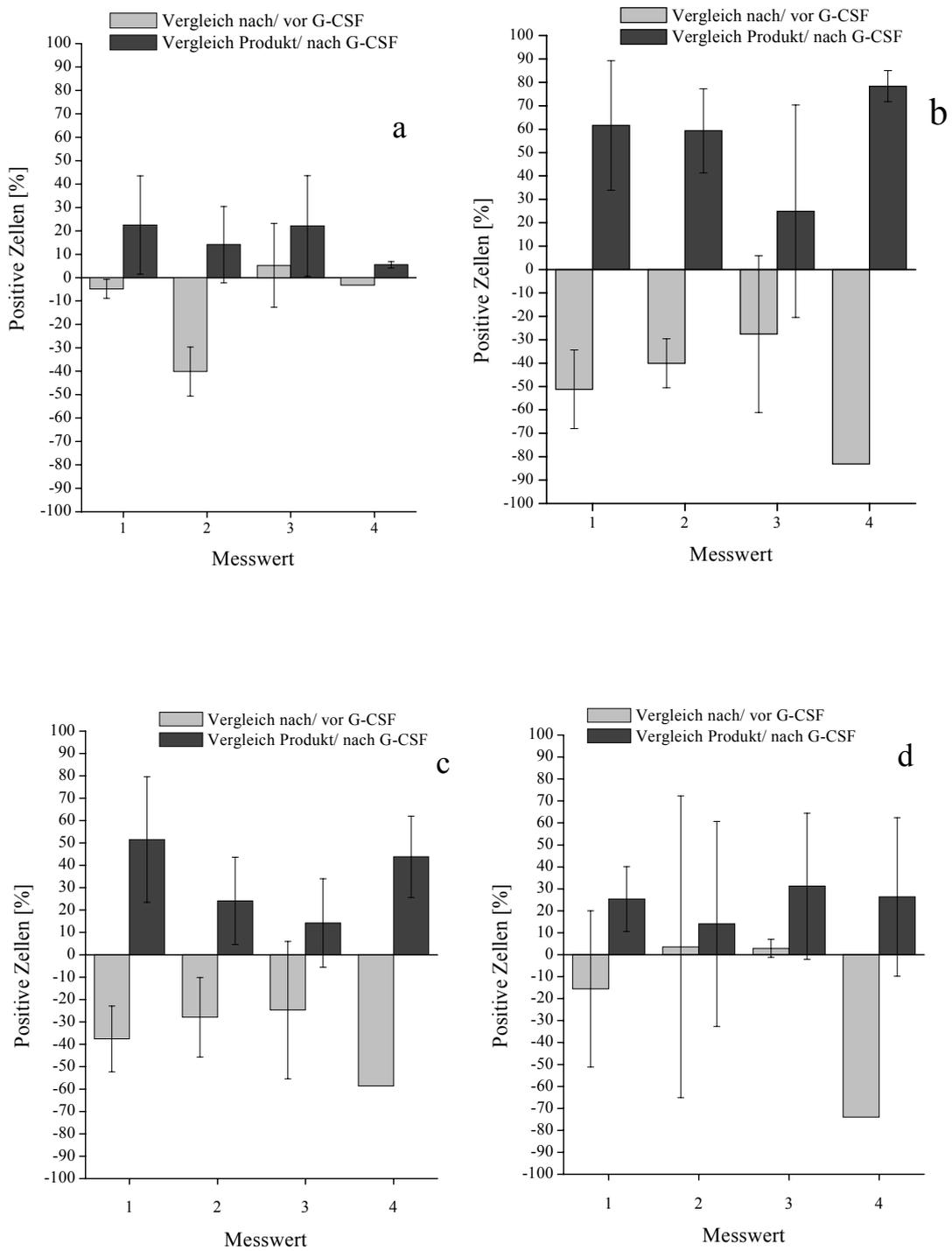


Abb. 19: Expression von Oberflächenantigenen: prozentualer Anteil Antigen-positiver Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl

a: Expression CD16 (FcγRIII)

b: Expression CD11a (Integrin)

c: Expression CD62L (L-Selectin)

d: Expression CD64 (FcγRI)

5.5 Zytokine

Auch über die statistische Auswertung mittels paarweisem Vergleich konnten nur geringfügige Veränderungen im Zytokingehalt der Plasmen oder Überstände vor und nach G-CSF-Gabe bzw. in den Produkten festgestellt werden (Tabelle 4).

Damit war weder ein statistisch relevanter Anstieg noch eine statistisch signifikante Verminderung des Zytokingehalts detektierbar.

| | | Zytokin [pg/ml] | | | | |
|---------------------|---|-----------------|---|----------------|---|----------------|
| | | IL-1 β | | IL-6 | | TNF α |
| Quelle | n | MW \pm SD | n | MW \pm SD | n | MW \pm SD |
| Plasma Meßwert1 | 7 | 0,1 \pm 1,3 | 8 | 0,2 \pm 2,1 | 6 | 0,8 \pm 1,3 |
| Plasma Meßwert 2 | 7 | 0 \pm 0,3 | 7 | -0,2 \pm 1,2 | 5 | 1,9 \pm 2,5 |
| Plasma Meßwert 3 | 4 | 0,3 \pm 0,3 | 4 | -0,7 \pm 1,4 | 3 | 0,0 \pm 0,0 |
| Plasma Meßwert 4 | 2 | 0,4 \pm 0,6 | 4 | -1,4 \pm 1,5 | 2 | 0,0 \pm 0,0 |
| Überstand Meßwert 1 | 4 | -0,5 \pm 0,9 | 4 | 0,3 \pm 1,0 | 6 | 3,2 \pm 7,8 |
| Überstand Meßwert 2 | 5 | 0,0 \pm 0,0 | 4 | 0,1 \pm 0,6 | 5 | -0,5 \pm 1,1 |
| Überstand Meßwert 3 | 3 | 0,0 \pm 0,0 | 3 | -0,1 \pm 0,1 | 2 | 0,6 \pm 0,8 |
| Überstand Meßwert 4 | 2 | 0,0 \pm 0,0 | 2 | 0,1 \pm 0,1 | 3 | 0 \pm 0,1 |

Tabelle 4: Zytokingehalt in Plasmen, paarweiser Vergleich (Plasma Meßwert 1 entspricht Vergleich zwischen Plasma nach erster G-CSF-Gabe und Plasma vor G-CSF-Gabe etc.); Zytokingehalt in Produktüberständen (Überstand Meßwert 1 entspricht Vergleich zwischen Überstand Konzentrat 1 und Plasma der ersten G-CSF-Gabe etc.)

Der Gehalt an IL-8 war in den Plasmen der G-CSF-stimulierten Spender im Vergleich zu dem der unstimulierten Spender niedriger (Abbildung 20). In den Überständen der Konzentrate war die IL-8-Konzentration im Vergleich zur entsprechenden G-CSF-Gabe erhöht (Abbildung

4.7). Lediglich im Fall des vierten Produkts war die Konzentration im Überstand des Produktes niedriger als im Plasma nach der vierten Stimulation. Alle Ergebnisse waren aufgrund der hohen Standardabweichungen aber nicht statistisch signifikant.

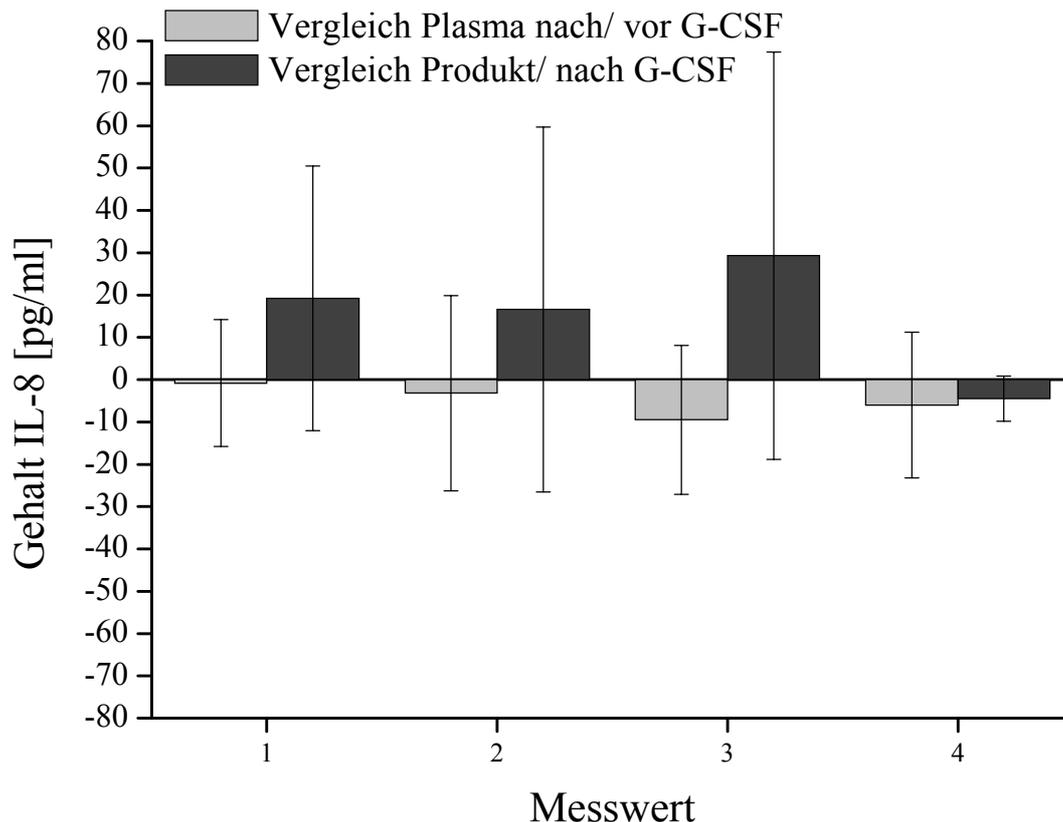


Abb. 20 IL-8-Gehalt in Plasma und Produktüberständen

5.6 Stimulus-response-coupling (LTB₄-Produktion)

Die Produktion von LTB₄ (Abbildung 21) wurde durch die G-CSF-Stimulation nur unwesentlich beeinflusst. Im Vergleich mit der unstimulierten Probe zeigten die Proben G-CSF-stimulierter Spender nur leicht erhöhte (Meßwert 1) oder erniedrigte (Meßwerte 2 und 3) LTB₄-Werte. Diese Ergebnisse waren nicht signifikant und müssen aufgrund der niedrigen Fallzahlen (Meßwert 3: n=1; Meßwert 4: n=0) vorsichtig interpretiert werden.

Auch in den Produkten zeigten sich im Vergleich zur Probe nach G-CSF nur geringfügige Veränderungen. Die große Abweichung bei Meßwert 4 muß aufgrund der hohen Standardabweichung relativiert werden. Auch die Ergebnisse der Produkte waren nicht statistisch signifikant.

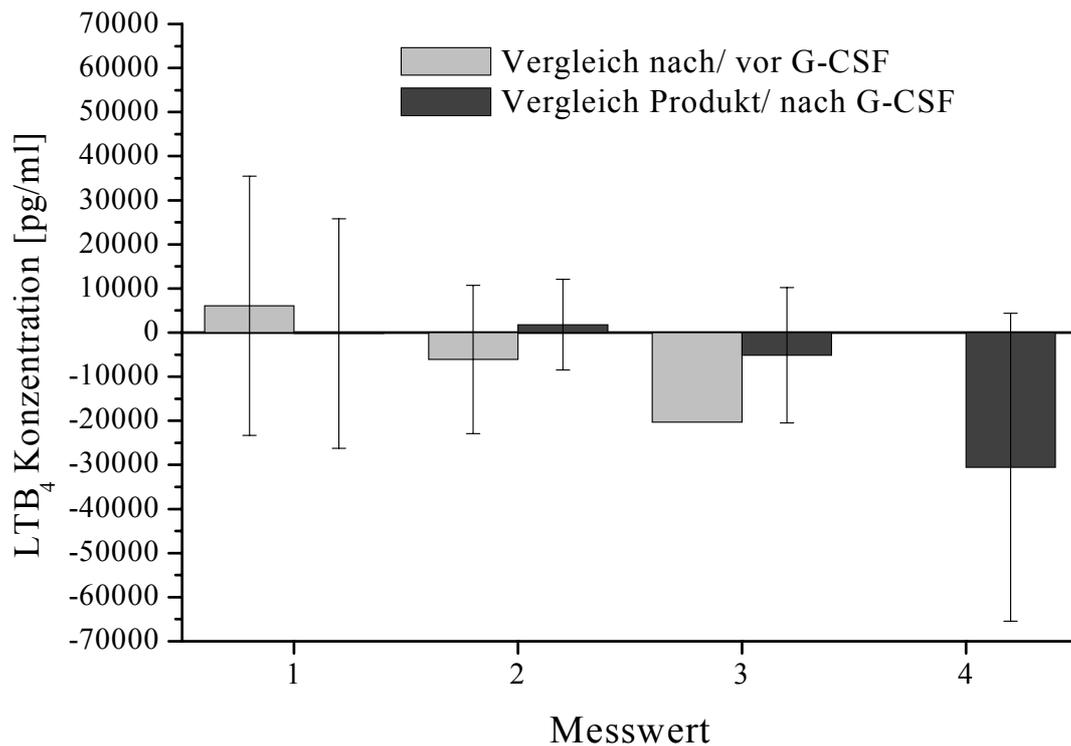


Abb. 21 Stimulus-response-coupling (LTB₄-Produktion)

6. Funktionstests bei Empfängern, paarweiser Vergleich

Entsprechend der Angaben unter Punkt 3. Funktionstests bei Empfängern, einfache Auswertung konnten auch hier aufgrund der geringen Granulozytenzahl im Blut der Empfänger keine Chemotaxis-Versuche und keine LTB₄-Bestimmung durchgeführt werden. Da nicht genügend Paare zum Vergleich gebildet werden konnten, mußte die Auswertung der Phagozytose von Conidien auf statistischem Wege entfallen.

Alle Proben waren auch hier 8 Stunden nach der Transfusion entnommen worden.

Der paarweise Vergleich wurde für die Patienten folgendermaßen durchgeführt:

Die Werte für die Patienten wurden mit der entsprechenden Probe des Spenders nach G-CSF und dem zugehörigen Konzentrat verglichen. D.h., die erste Transfusion des Patienten mit der ersten G-CSF-Stimulation seines Spenders und dem von diesem Spender gewonnenen ersten Produkt (Meßwert 1). Die Werte des Spenders nach G-CSF und die Werte der Konzentrate wurden dabei von den Ergebnissen aus dem Spenderblut subtrahiert. Die Patienten konnten nur mit PBS-verdünnten Spenderproben/ Konzentraten verglichen werden, da bei Medium-verdünnten Proben aufgrund geringerer Datenfülle keine ausreichende Paarbildung möglich war.

6.1 Phagozytose

6.1.1 Phagozytose FITC-markierter E.coli

Verglich man die Werte der Patientenproben mit den Werten der Spender nach der entsprechenden G-CSF-Stimulation (Abbildung 22, hellgraue Balken), so konnte man erkennen, dass die Ergebnisse in den Patientenproben am Meßwert 1 und 3 schlechter und am Meßpunkt 2 und 4 besser als die Ergebnisse aus Spenderproben waren. In keinem Fall waren die Ergebnisse aber signifikant, weil die Standardabweichungen sehr hoch waren.

Im Vergleich zu den Konzentraten waren die Ergebnisse aus Patientenproben aber alle besser. Dies bedeutet, dass die in den Produkten gemessene verschlechterte Phagozytoseleistung (siehe 15a) sich in den Patienten wieder regeneriert hatte. Bis auf den Meßwert drei (drittes Produkt im Vergleich zur Patientenprobe nach dritter Transfusion) war die Phagozytoseaktivität der Granulozyten aus Patientenblut signifikant besser als die der Granulozyten aus PBS-verdünnten Produkten (Meßwert 1: $p = 0,002$; Meßwert 2: $p = 0,0004$; Meßwert 4: $p = 0,04$).

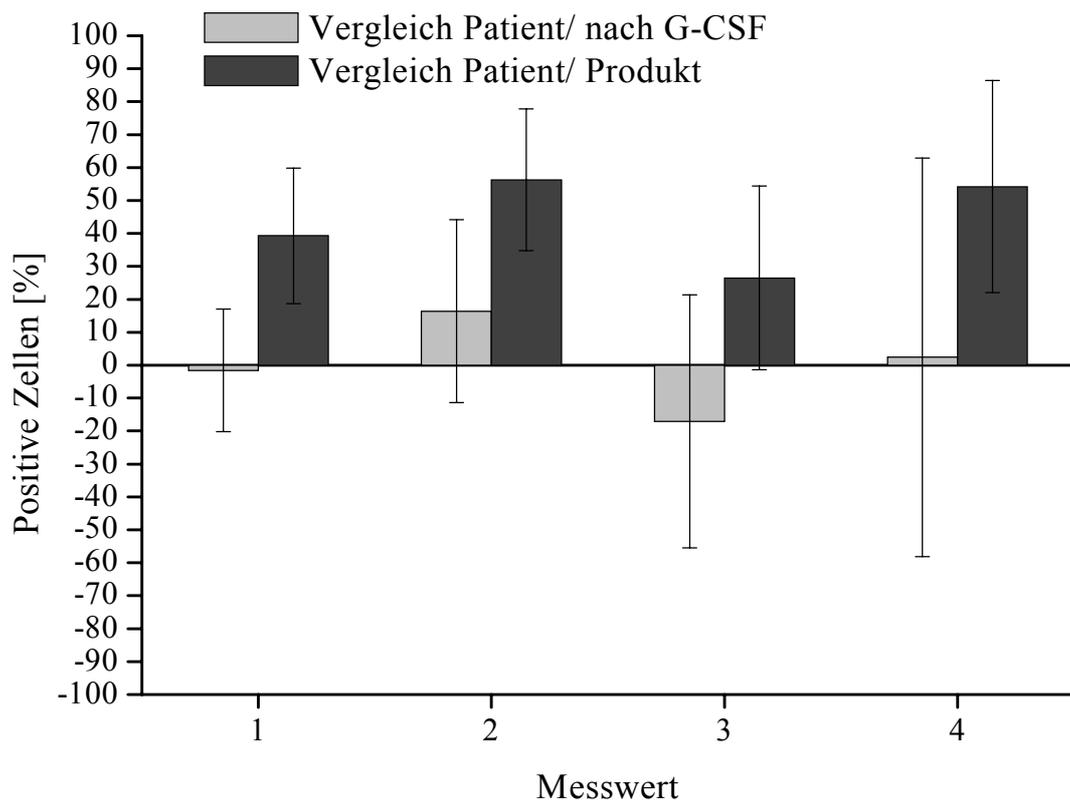


Abb. 22 Phagozytose FITC-markierter *E.coli*: prozentualer Anteil phagozytierender Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl

6.2 Oxidativer Burst

6.2.1 Stimulation mit E.coli

Nach Stimulation mit *E.coli* produzierten in den Patientenproben weniger Zellen reaktive Sauerstoffverbindungen als in den Proben, die den Spendern nach G-CSF-Gabe entnommen worden waren (Abbildung 23, hellgraue Balken). Im paarweisen Vergleich mit den Produkten lagen die Werte der Patienten aber deutlich besser, die Fähigkeit zum oxidativen Burst schien hier wieder verbessert zu sein (Abbildung 23, dunkelgraue Balken). In dieser Messreihe erreichte nur der Vergleich zwischen Zellen des Patienten nach der ersten Transfusion und dem ersten Produkt statistische Signifikanz ($p = 0,01$).

Auch hier war der negative Einfluß der Apherese im Patienten also wieder verschwunden.

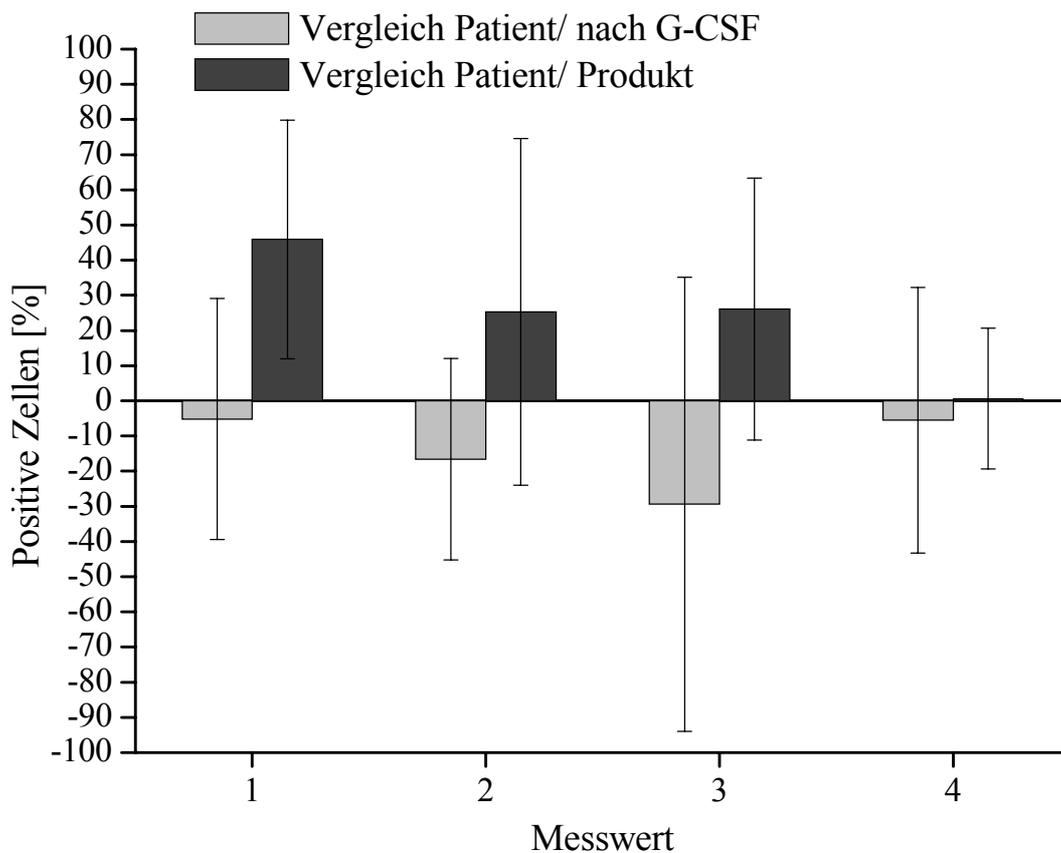


Abb. 23 Oxidativer Burst nach Stimulation mit *E.coli*: prozentualer Anteil Radikale produzierender Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl

6.2.2 Stimulation mit *f*-MLP

Im paarweisen Vergleich mit den stimulierten Spendern und den Produkten zeigten alle Patientenproben eine verminderte Fähigkeit, reaktive Sauerstoffspezies zu bilden (Abbildung 24). Damit hoben sich die in den Proben nach G-CSF und z.T. in den Produkten detektierten Verbesserungen des *f*-MLP-induzierten oxidativen Bursts (vgl. Abb. 18a) in den Patienten wieder auf. Die detektierte verminderte Radikalbildung der Granulozyten aus Patientenproben war aber nur beim Vergleich der vierten Produkte mit Zellen nach der vierten Transfusion statistisch signifikant ($p = 0,04$).

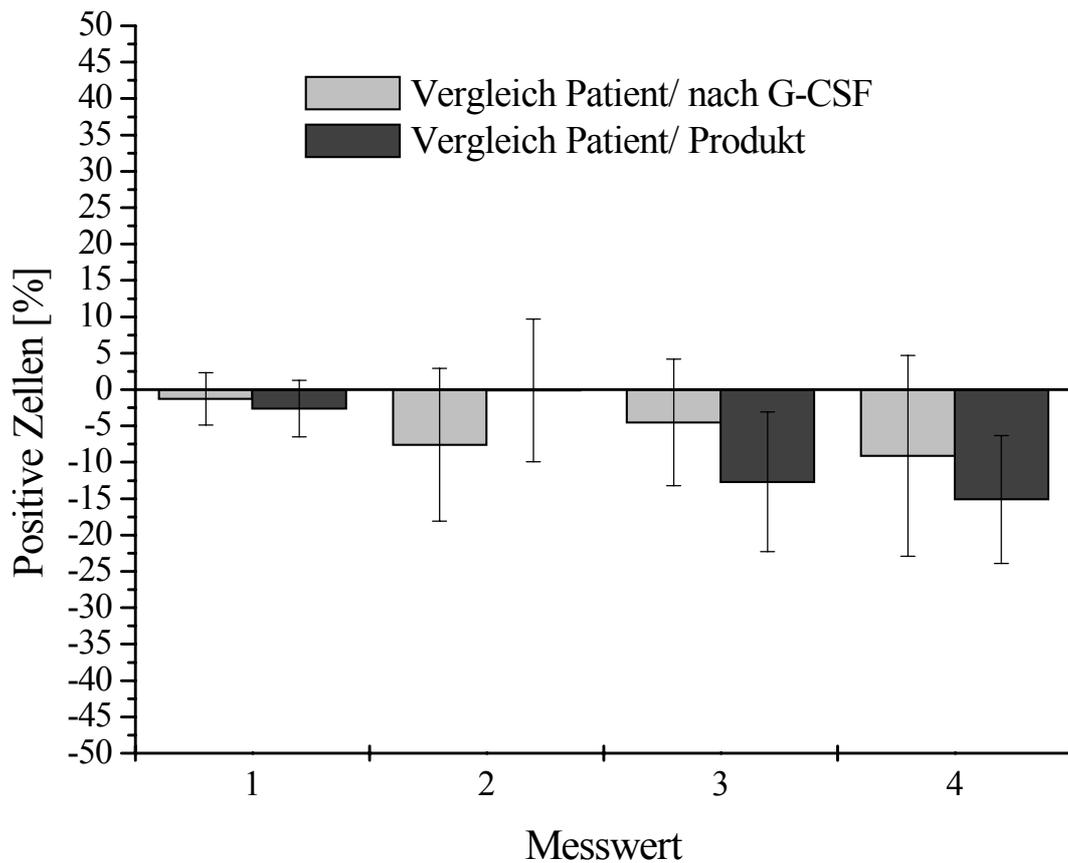


Abb. 24 Oxidativer Burst nach Stimulation mit f-MLP: prozentualer Anteil Radikale produzierender Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl

6.3 Oberflächenantigene, Aktivierungsmarker

Die Expression der gemessenen Oberflächenantigene war im Patientenblut meist geringer als in Proben nach G-CSF-Gabe oder aus dem Konzentrat (Abbildung 25). Dies galt für fast alle Antigene mit zwei Ausnahmen: CD16 wurde nach der dritten Transfusion auf Granulozyten des Patienten im Vergleich zum Spender nach der dritten G-CSF-Gabe leicht vermehrt exprimiert (Abb. 25a, Meßwert 3, hellgrauer Balken). Diese Erhöhung war jedoch nur wenig ausgeprägt (unter 10%), und das Ergebnis beruht auf einem einzigen Vergleichspaar aus Spender und Patient.

Die zweite Ausnahme bildete die Expression von CD64. Beim Vergleich zwischen der zweiten Transfusion des Patienten und dem zweiten Produkt (Abb. 25d, Meßwert 2, dunkelgrauer

Balken) war die Expression des Oberflächenantigens CD64 auf den Granulozyten der Patienten höher als im zweiten Konzentrat. Allerdings war hier die Standardabweichung sehr hoch. Die zuvor in den meisten Konzentraten detektierten Erhöhungen der Antigenexpression (Vgl. Abb. 19) ging also im Patienten wieder zurück. Die Patientendaten müssen dabei vorsichtig interpretiert werden, da z.T. nur ein Vergleichspaar gebildet werden konnte. Für den Vergleich zwischen vierter Stimulation, viertem Produkt und vierter Transfusion konnten keine Wertepaare gebildet werden.

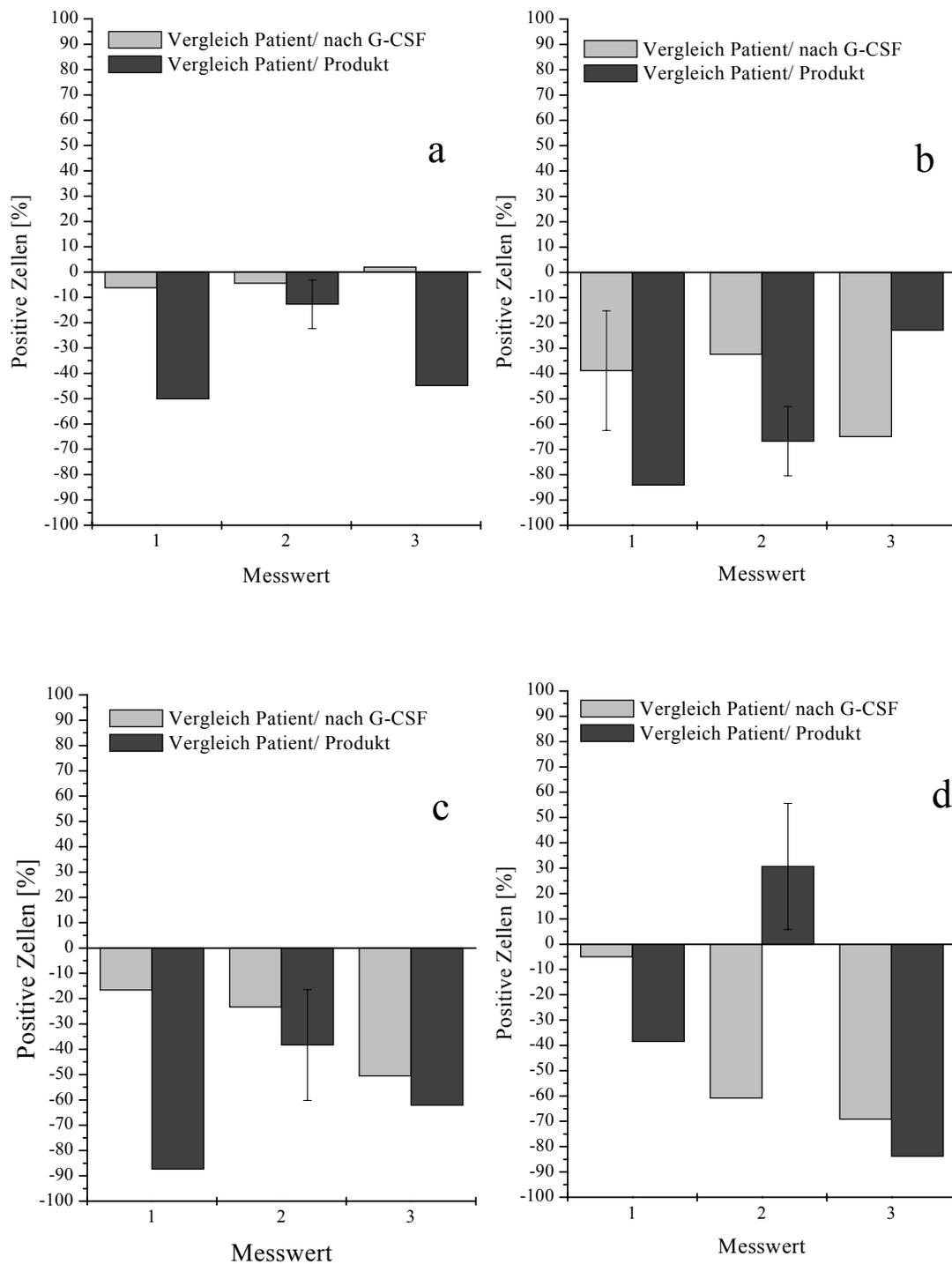


Abb. 25 Expression von Oberflächenantigenen: prozentualer Anteil Antigen-positiver Zellen an der Gesamt-Granulozytenzahl

- a: Expression CD16 (F γ RIII)
- b: Expression CD11a (Integrin)
- c: Expression CD62L (L-Selectin)
- d: Expression CD64 (F γ RI)

7. PCR, GAT, GIFT und MAIGA

7.1 PCR zur Typisierung granulozytärer Antigene

Wie bereits unter Material und Methoden beschrieben, wurden zur Typisierung granulozytärer Antigene verschiedene gesunde Spender getestet. Nach der PCR konnte ein Spender bestimmt werden, dessen Genotyp homozygot NA2 (Spender A), ein Spender, der homozygot NA1 war (Spender B) und zwei Spender, die heterozygot auf NA1 und NA2 waren (Spender C und D). Zur Bestimmung der gegen Granulozyten gebildeten Antikörper im Serum der Patienten im MAIGA wurden die Granulozyten eines der beiden homozygoten und die Granulozyten eines der beiden heterozygoten Spender verwendet. Die Antikörper konnten so nach dem Ausschlußverfahren bestimmt werden.

7.2 Granulozyten-Agglutinationstest (GAT)

Der GAT wurde insgesamt 27 mal mit Seren drei verschiedener Patienten und Zellen von fünf Spendern durchgeführt. Ein Patient erhielt dabei Konzentrate von drei verschiedenen Spendern. In den 27 Ansätzen ergaben sich dabei lediglich sechs positive Ergebnisse. Die ersten beiden positiven Ergebnisse zeigten sich bei der zweiten Transfusion eines Patienten mit dem zweiten Produkt eines Spenders. Dort trat die Agglutination bereits nach zwei Stunden auf, Serum des Patienten agglutinierte sowohl isolierte Granulozyten des Spenders nach der zweiten G-CSF-Applikation als auch Granulozyten aus dem zweiten Konzentrat.

Im dritten und vierten Fall konnte eine Agglutination erst nach 12 Stunden beobachtet werden, auch hier trat sie bei der zweiten Transfusion mit dem zweiten Produkt eines Spenders auf (Patient nicht mit dem ersten Fall identisch). Wieder war der GAT sowohl mit isolierten Zellen aus dem Blut des Spenders nach der zweiten G-CSF-Gabe als auch mit Zellen aus dem zweiten Produkt positiv.

Im fünften und sechsten Fall war der GAT mit Zellen nach der ersten Stimulation des Spenders und dem entsprechenden ersten Produkt positiv und zwar nach 12 Stunden Inkubationszeit. Dieser dritte Patient war weder mit dem ersten noch mit dem zweiten identisch.

7.3 Granulozyten-Immunfluoreszenz-Test, GIFT

Der GIFT wurde insgesamt 17 mal (drei Patientenseren, fünf Spender) durchgeführt. Es traten aber dabei nur zwei positive Fälle auf. Die im GAT positiv getesteten Proben (siehe Punkt 7.2) waren unter den untersuchten.

Der einzige als positiv befundene GIFT trat bei dem unter 7.2 aufgeführten zweiten Fall auf. D.h., das Patientenserum, das im GAT sowohl mit Zellen nach der zweiten G-CSF-Gabe als auch mit Zellen aus dem zweiten Produkt reagiert hatte, reagierte im Immunfluoreszenztest lediglich mit den Granulozyten des Konzentrats. Der Patient erhielt Zellen von insgesamt drei Spendern. Er reagierte mit den Granulozyten des zweiten Spenders, nicht aber mit Zellen des ersten oder des dritten Spenders. Die Reaktion war allerdings nur sehr schwach, 3,05% der im Durchflußzytometer gezählten Zellen waren positiv.

Diese Proben wurden später im MAIGA auf den genauen Typ der Antigene untersucht (siehe Punkt 7.4).

7.4 Monoclonal-antibody-specific immobilization of granulocyte antigens (MAIGA)

Die Probe, die sowohl im GAT als auch im GIFT positiv getestet worden war, wurde anschließend im MAIGA-Test auf den genauen Typ der vorliegenden granulozytären Antigene untersucht.

Dabei wurde das Patientenserum mit Zellen des Spenders A (homozygot NA2) und Zellen des Spenders C (heterozygot NA1/NA2) inkubiert.

Weder mit den Zellen des einen, noch mit den Zellen des anderen Spenders konnte eine Reaktion nachgewiesen werden. Auch bei der Wiederholung des Assays konnten keine Granulozyten-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden.

IV. Diskussion

Granulozyten übernehmen im Immunsystem eine wichtige Aufgabe: Sie wandern in einen Infektionsherd ein, fressen die Erreger und töten sie ab. Patienten, denen diese Zellen aufgrund einer z.B. chemotherapeutischen Behandlung fehlen, sind besonders gefährdet, während dieser Phase der Neutropenie an einer bakteriellen oder Pilzinfektion zu erkranken. Trotz neuer Entdeckungen und breiter Anwendung der antimikrobiellen Therapie, sterben nach wie vor ca. 7% der Patienten mit akuter myeloischer Leukämie während der Behandlung aufgrund einer Infektion (The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group 1997). Nach einer intensiven Chemotherapie entwickeln 7,6% der Patienten eine Pilzinfektion, wobei die Sterblichkeit bei invasiven Infektionen dieser Art nahezu 100% erreicht (Peters et al. 1996).

Die Idee, die fehlenden Zellen und die damit fehlende Abräumfunktion der Granulozyten durch eine Transfusion zu ersetzen, stammt aus den 1970er und 1980er Jahren (Graw et al. 1972; Higby et al. 1975; Fortuny et al. 1975; Vogler et al. 1977; Alavi et al. 1977; Herzig et al. 1977; Winston et al. 1982): Die durchgeführten Studien, die sich mit der prophylaktischen und therapeutischen Anwendung der Granulozyten auseinandersetzten, zeigten dabei wechselnden Erfolg. Hauptproblem war dabei die meist geringe Zahl an Granulozyten, die von gesunden Spendern gewonnen werden konnte.

Mitte der 1990er Jahre wurde der Granulozyten-koloniestimulierende Faktor G-CSF erstmals in rekombinanter Form hergestellt. Filgrastim (rhG-CSF, Neupogen[®], Amgen, Thousand Oaks, CA, USA) wird von einem Laborstamm von *E.coli* produziert, in dessen Genom das Gen für den humanen Granulozyten-koloniestimulierenden Faktor eingefügt wurde. Das so erzeugte G-CSF ist im Unterschied zum natürlichen G-CSF nicht glykosyliert und trägt am N-Terminus die Aminosäure Methionin. Die biologischen Eigenschaften unterscheiden sich aber nicht vom natürlichen G-CSF (Frampton et al. 1994). Mit dieser Entwicklung besteht nun die Möglichkeit, größere Zellzahlen zu gewinnen, indem die Granulozytenspender mit diesem Wachstumsfaktor konditioniert werden und große Mengen Granulozyten ins periphere Blut ausschütten. Innerhalb weniger Stunden nach Neupogen[®]-Gabe steigt die Zahl der zirkulierenden Granulozyten im Blut deutlich an, Granulozyten werden aus dem Knochenmarkspool in den zirkulierenden Pool ausgeschüttet, die Produktion im Knochenmark wird angeregt und die Differenzierung der Zellen wird beschleunigt (Price 2000).

In dieser Arbeit konnte der Anstieg der Granulozytenzahl im Blut durch Stimulation der Spender mit Neupogen[®] erwartungsgemäß (Hester et al. 1995) gezeigt werden. Nach G-CSF-Gabe stieg die Zahl der Granulozyten im peripheren Blut der Spender auf $27,5 \times 10^3$ Zellen/ μ l an. Mittels Zytapherese konnten so durchschnittlich $5,0 \times 10^{10}$ Granulozyten pro Granulozytenkonzentrat gesammelt werden.

Nicht nur die Zahl der applizierten Zellen, sondern selbstverständlich auch deren Funktionstüchtigkeit spielen eine entscheidende Rolle, wenn die Transfusion Erfolg versprechen soll. Um Infektionen verhindern oder behandeln zu können, müssen die Zellen ihre besonderen Fähigkeiten behalten. Verschiedene Arbeiten beschrieben nur geringfügige Veränderungen der Granulozytenfunktionen nach G-CSF-Gabe, wobei die meisten von nur einer einzelnen G-CSF-Gabe ausgingen (Price 2000; Hübel et al. 2001). Die verschiedenen Funktionen wurden meist 24 Stunden nach der G-CSF-Stimulation untersucht, während die Granulozytenspender im Allgemeinen erst 8-12 Stunden vor der Apherese eine Injektion erhalten. Die mehrfache Applikation von G-CSF und deren Einfluß auf die Funktion der Granulozyten ist bis jetzt nur wenig untersucht worden (Hübel et al. 2001). Wurden mehrfach Dosen von G-CSF appliziert, so wurde nicht nach jeder Applikation eine Apherese durchgeführt. Untersuchungen, die die verschiedenen Funktionen der Zellen nach mehrfacher G-CSF-Applikation, in den Konzentraten und in den Patienten verfolgen, wurden bisher überhaupt noch nicht durchgeführt. Daher konzentrierte sich diese Arbeit auf die wichtigsten Funktionen der Granulozyten auf ihrem Weg vom unstimulierten Spender über G-CSF-Gabe und Granulozytenkonzentrat bis hin zum Patienten, in dem die Zellfunktion erhalten sein muß, um einen therapeutischen Erfolg erzielen zu können.

1. Granulozytenkonzentrate und klinisches Outcome

1.1 Granulozytenkonzentrate-Zusammensetzung

Nach der Untersuchung der fertigen Präparate zeigten die nach dem Tübinger Protokoll gewonnenen Granulozytenpräparate eine hohe Reinheit (Huestis et al. 1994): Bezogen auf den Gesamtgehalt an Leukozyten bestanden die Aphereseprodukte zu 80,4% aus neutrophilen Granulozyten. Der Hb-Wert mit 1,7 betonte noch einmal, wie wichtig die blutgruppenkompatible Transfusion der Konzentrate ist, da eine relativ große Menge an Erythrozyten mit übertragen werden. Die Beobachtung des Hb-Werts im Produkt ist auch deswegen von großer

Wichtigkeit, weil der Spender neben den erwünschten Granulozyten auch rote Blutkörperchen verliert. Gleiches gilt auch für die Thrombozyten: Zum einen werden eine gewisse Menge Plättchen dem Patienten übertragen (im Durchschnitt $1,2 \times 10^{11}$ pro Präparat), zum anderen verliert der Spender dieselbe Menge. Die gleichzeitige Transfusion der Thrombozyten kann für den Empfänger von Nutzen sein, da diese Patienten meist ebenfalls thrombozytopenisch sind (Huestis et al. 1994).

Wie bereits aufgeführt konnten durchschnittlich $5,0 \times 10^{10}$ Granulozyten pro Präparat gewonnen und appliziert werden. Das bedeutet, daß mit der G-CSF-Gabe ein Vielfaches mehr an Granulozyten gesammelt werden konnte als in den Jahren zuvor mit unstimulierten Spendern (durchschnittlich $0,2-0,8 \times 10^{10}$ Neutrophile) oder nach Stimulation der Spender mit Glukokortikoiden (durchschnittlich $1,5-2,5 \times 10^{10}$ Neutrophile). Während durch die Applikation von $0,2-0,8 \times 10^{10}$ Zellen nur etwa 0,5% des normalen Körpervorrats (wovon ca. 50% der Zellen zirkulieren) an Granulozyten bei einem Erwachsenen ersetzt werden, können mit 5×10^{10} Zellen immerhin 2,5%, also die fünffache Menge, ersetzt werden (Young 1983).

1.2 Klinisches Outcome

Die Auswertung der Patientendaten (siehe „Ergebnisse“ Punkt 1.2) ergab eine positive Bewertung der Transfusionen: Nur 9 Erwachsene und 5 Kinder starben trotz Transfusion eines oder mehrerer Granulozytenkonzentrate an einer Infektion. Bezogen auf die Gesamtzahl an Patienten (45 Erwachsene und 15 Kinder), die im Untersuchungszeitraum beobachtet werden konnten, sind dies lediglich 23,3% (20,0% der Erwachsenen und 33,3% der Kinder), die keinen Nutzen von der Granulozytentransfusion davontrugen.

Bei keinem der Empfänger wurden unerwünschte pulmonale Reaktionen festgestellt.

Diese Daten belegen den positiven Effekt der zusätzlich zur bestmöglichen antimikrobiellen Therapie durchgeführten Granulozytenapplikation. Trotz modernster Antibiotika und Antimykotika kann die zusätzliche Gabe von Spendergranulozyten also offensichtlich die Abwehr von Infektionen im Patienten unterstützen. Diese Ergebnisse korrespondieren mit einigen bereits veröffentlichten Studien, widersprechen aber anderen, die Granulozytentransfusionen keinen zusätzlichen Nutzen zur Antibiotika- und Antimykotikatherapie zusprachen (Vamvakas et al. 1996). Viele der Studien, die keinen Nutzen detektieren konnten, waren aber nicht in der Lage, adäquate Zellzahlen zu applizieren, da die Möglichkeit, die Spender mit G-CSF zu stimulieren, noch nicht gegeben war.

2. Funktionstests in Spendern und in Konzentraten

Zum besseren Vergleich sollen die beiden Verfahren, nach denen die verschiedenen Funktionstests ausgewertet wurden (siehe Kapitel „Ergebnisse“), gemeinsam diskutiert werden. Im folgenden werden also sowohl die einfache als auch die statistische Auswertung für jede einzelne untersuchte Funktion der Granulozyten besprochen werden.

2.1 Chemotaxis

Weder die Konditionierung der Spender mit G-CSF noch die Gewinnung der Zellen per Apherese beeinflussten die chemotaktischen Eigenschaften der Granulozyten in statistisch signifikanter Weise. Die im Agarosegel-Assay ermittelte Wanderstrecke und die im Boyden-Kammer-Assay bestimmte Anzahl gewanderter Zellen wurden nicht signifikant durch die in-vivo-Gabe von Neupogen[®] oder die Zytapherese verändert. Diese Ergebnisse zeigten sich sowohl in der einfachen als auch in der statistischen Auswertung.

Im Fall der Agarosegele lagen die Wanderstrecken nach G-CSF-Gabe bei einfacher Auswertung im Bereich der Wanderstrecken unstimulierter Spender, die Produkte lagen z.T. sogar leicht darüber, mindestens aber im vergleichbaren Rahmen (vgl. Abb. 1a). Beim paarweisen Vergleich zeigten die Zellen nach G-CSF eine leicht verminderte Wanderstrecke, die Produkte lagen mit einer Ausnahme (Produkte 3) aber wieder bei längeren Wanderstrecken als die Zellen nach G-CSF (vgl. Abb. 14a). Alle Standardabweichungen waren aber sehr hoch.

Insgesamt betrachtet konnte kein Einfluß, weder der G-CSF-Gabe noch der Apherese, auf die Wanderung im Agarosegel detektiert werden. Die in den Graphiken und im Text beschriebenen leichten Abweichungen nach oben und/oder unten sind auf interindividuelle Schwankungen zwischen den einzelnen Spendern und auf die Meßgenauigkeit im Gelsystem zurückzuführen: Beispielsweise bietet die visuelle Auswertung unter dem Mikroskop Fehlerquellen, die sich in der Schwankungsbreite der Ergebnisse niederschlagen.

Die Anzahl der gewanderten Zellen, wie sie im Boydenkammer-Assay getestet wurde, war nach einfacher Auswertung durch die G-CSF-Gabe unbeeinflusst (vgl. Abb. 1b). In den Produkten war die Zahl der Zellen leicht vermindert, die Ergebnisse aber nicht statistisch signifikant. Ein leichter Einfluß von Neupogen[®] und Apherese schien sich abzuzeichnen, da die Zahl wandernder Zellen von der ersten zur dritten G-CSF-Gabe und vom ersten zum dritten Produkt hin abnahm. Allerdings war dieser Effekt sowohl bei der vierten G-CSF-Gabe als auch beim vierten Produkt wieder hinfällig. Nach statistischer Auswertung zeigte die G-CSF-

Applikation wenig bis gar keinen Einfluß (vgl. Abb. 14b), lediglich die zweite Gabe schien die Zahl der wandernden Zellen negativ zu beeinflussen. Allerdings war hier die Standardabweichung sehr hoch, wodurch dieses Ergebnis in Frage gestellt wurde. Auch die Produkte waren im Vergleich zur entsprechenden Stimulation der Spender in dieser Funktion etwas eingeschränkt. Die Ergebnisse der Boydenkammer zeigten damit einen leichten Abfall der chemotaktischen Funktion der Zellen nach der Apherese. Zu beachten galt aber dabei, daß die Standardabweichungen auch in diesem Versuch hoch waren, es also zu großen interindividuellen Schwankungen kam. Aber auch der Versuchsaufbau kann einige dieser Schwankungen erklären: Trotz Vorbehandlung der Filter ist es beispielsweise möglich, daß gewanderte Zellen an der Filterunterseite adhären und sich so der Auswertung „entziehen“. Unvollständige Lyse und Übertragung eventuell an den Kammern haftender Zellen auf die Mikrotiterplatte können die Ergebnisse ebenfalls beeinflussen.

Chemotaxis, untersucht als Wanderung unter Agarose und als Wanderung durch Filterporen, blieb im Rahmen dieser Arbeit sowohl durch die G-CSF-Gabe als auch durch die Apherese unbeeinflusst. Es konnten weder positive Einflüsse, also eine Steigerung der Wanderstrecke oder eine vermehrte Zahl wandernder Zellen, noch entsprechende negative Einflüsse detektiert werden. Diese Ergebnisse widersprechen teilweise bereits veröffentlichten Arbeiten (Höglund et al. 1997):

Während Höglund et al. 1997 zeigten, daß die in-vivo-Applikation von G-CSF die chemotaktischen Eigenschaften der Granulozyten verminderte (gemessen als Wanderung in der Boydenkammer), konnte die vorliegende Arbeit nachweisen, daß die Zellen ihre Fähigkeit zur Chemotaxis beibehielten. Wichtig war hierbei, daß Höglund und Mitarbeiter die Zellen nur aus Spendervollblut isoliert untersuchten, Aphereseprodukte waren in die Versuchsreihe nicht eingeschlossen. Außerdem untersuchte die Arbeitsgruppe die Zellfunktion erst 24 Stunden nach der G-CSF-Gabe. Proben, auf deren Messung die vorliegenden Ergebnisse beruhen, wurden aber bereits 8-12 Stunden nach Neupogen[®]-Gabe entnommen, da dies dem Zeitpunkt direkt vor der Apherese entsprach.

Im Gegensatz zu Veröffentlichungen von Katoh et al. (Katoh et al. 1995), die bei Leukapheresezellen eine erhöhte chemotaktische Wanderung feststellten, wurde im Rahmen dieser Arbeit kein Einfluß der Apherese auf die Chemotaxis detektiert.

2.2 Phagozytose

2.2.1 Phagozytose FITC-markierter E.coli

Die nach Stimulation und aus Produkten gewonnenen Proben, in denen die Phagozytoseleistung der enthaltenen Granulozyten ermittelt wurde, mußten wie beschrieben zur Messung verdünnt werden. Die erste Versuchsreihe wurde mit PBS-verdünnten Proben durchgeführt.

Nach einfacher Auswertung konnte dabei kein Einfluß der G-CSF-Stimulation auf die Phagozytose von *E.coli* nachgewiesen werden (vgl. Abb. 2a). Weder die einzelne Gabe einer Neupogen[®]-Dosis (Meßpunkt 1), noch die wiederholte Applikation von G-CSF (Meßpunkte 2 bis 4) zeigten einen signifikanten Einfluß auf die Phagozytose der Granulozyten. Großen Einfluß schien dagegen die Apherese-prozedur zu haben: Granulozyten aus den Konzentraten, deren Fähigkeit zur Phagozytose getestet wurde, zeigten eine signifikant schlechtere Leistung als Granulozyten der entsprechenden G-CSF-Stimulation.

Im paarweisen Vergleich ergab sich ein ähnliches Bild: Nach G-CSF-Gabe zeigten die Granulozyten aus Vollblut stimulierter Spender gegenüber den Zellen unstimulierter Spender eine leicht verminderte Phagozytoseleistung. Eine Ausnahme bildete lediglich der Meßpunkt 3, dort waren die Zellen aus den stimulierten Spendern besser als die unstimulierter Spender. Die großen Standardabweichungen sind hier ebenfalls von Bedeutung, sie relativieren die Aussagekraft dieser Beobachtung. Auch im paarweisen Vergleich zeigte sich aber die deutlich schlechtere Leistung der Granulozyten aus den Konzentraten: Im Vergleich zu den Zellen der entsprechenden Neupogen[®]-Gabe zeigten diese eine verminderte Phagozytoseleistung. Insgesamt schien sich damit die Phagozytose über G-CSF-Gabe und Apherese kontinuierlich zu verringern.

Die Ergebnisse deuteten an, daß die Zellen in den Produkten nur noch sehr begrenzt zur Phagozytose fähig waren und damit einen geringeren Nutzen für den Patienten haben würden.

Da bereits hinreichend bekannt ist, daß zur Aktivierung der Phagozyten verschiedene Elemente des Serums notwendig sind (Janeway et al. 1997), lag die Vermutung nahe, daß durch die Verdünnung der Zellen in der Probe ein Mangel an solchen Faktoren herrschte. Im Serum sind Komplementfaktoren enthalten, die in den Blutkreislauf eingetretene Pathogene opsonisieren, indem sie an diese Erreger binden. Die so beladenen Pathogene werden von den phagozytierenden Zellen erkannt und über die Komplementfaktoren an entsprechenden Rezeptoren auf der Phagozytenoberfläche gebunden (Janeway et al. 1997). Durch den Verdünnungsschritt bestand nun die Gefahr, daß in der Umgebung der Zellen zu wenige dieser Faktoren

vorhanden waren, die Pathogene, hier die FITC-*E.coli*, nicht erkannt und die Granulozyten nicht zur Phagozytose angeregt wurden.

Um diese Fehlerquelle zu eliminieren, wurden in einer zweiten Versuchsreihe die Zellen nach G-CSF-Stimulation und die Zellen aus den Konzentraten mit Medium (RPMI 1640, HEPES-gepuffert, mit 10% AB-Serum) verdünnt.

Die Proben G-CSF-stimulierter Spender zeigten nach dieser Veränderung des Versuchsaufbaus eine leicht verbesserte Phagozytoseleistung im Vergleich zu Granulozyten unstimulierter Spender (nicht signifikant). Dies bestätigte sowohl die einfache Auswertung als auch der paarweisen Vergleich (vgl. Abb. 2b und Abb. 15b). Damit zeichnete sich eine völlig andere Tendenz ab, nämlich ein positiver Einfluß der in-vivo-Applikation von Neupogen[®] auf die Phagozytose der Granulozyten. Außerdem wurde damit der vermutete Einfluß des Verdünnungsmediums belegt.

Die Bedeutung des Verdünnungsmediums ließ sich bei der Auswertung der Proben aus den Granulozytenkonzentraten noch klarer darstellen: Die Granulozyten aus den Produkten zeigten zwar sowohl in der einfachen Auswertung (vgl. Abb. 2b) als auch im paarweisen Vergleich (vgl. Abb. 15b) eine etwas schlechtere Leistung als die Zellen der entsprechenden G-CSF-Gabe, dieser Funktionsverlust war aber weitaus geringer ausgeprägt als nach der Verdünnung der Proben mit PBS. Wenn auch die Proben aus den Produkten wieder zu einem geringeren Prozentsatz phagozytierten als die Proben der stimulierten Spender, so waren diese Ergebnisse dennoch mit denen der Granulozyten vor G-CSF-Gabe vergleichbar (vgl. Abb. 2b). Der positive Effekt der Neupogen[®]-Stimulation wurde demnach wieder aufgehoben und die Zellen fielen auf ihr ursprüngliches Leistungsniveau zurück. Der paarweise Vergleich ergab insgesamt keine negative Beeinflussung der Phagozytose FITC-markierter *E.coli* durch G-CSF-Stimulation oder Apherese (vgl. Abb. 15b).

Die zweite Versuchsreihe demonstrierte nachdrücklich, daß die zunächst schlechte Phagozytoseleistung der Leukapheresezellen merklich durch die Verdünnung mit PBS beeinflusst worden war. Damit konnte zwar ein leicht negativer Einfluß der Apherese nicht widerlegt werden, deutlich wurde aber auch, daß dieser Einfluß nicht signifikant war, und die Zellen eine zur Ausgangssituation vor G-CSF-Gabe vergleichbare Leistung beibehielten.

Die Stimulation der Spender mit Neupogen[®] in vivo konnte die Leistung der Zellen verbessern. Dies war zuvor schon demonstriert worden (Dale et al. 1995; Liles et al. 1997). Die Arbeitsgruppe um Höglund wies 1997 in einer Studie ebenfalls nach, daß die in-vivo-Applikation von G-CSF die Phagozytose von Latexpartikeln verbesserte (Höglund et al. 1997). Die Messung der Phagozytose-Eigenschaften wurde dabei aber erst 24 Stunden nach

G-CSF-Gabe durchgeführt. Die Arbeitsgruppe Schafer berichtete im Jahr 2000 (Schafer et al. 2000) ebenfalls vom positiven Effekt der in-vivo-Applikation von G-CSF auf verschiedene Funktionen der Neutrophilen. In ihren Untersuchungen an Patienten, die sich einer Oesophagektomie hatten unterziehen müssen, zeigten sie, daß die perioperative G-CSF Behandlung die Phagozytose um den Faktor 1,2 steigerte. Im Unterschied zu den Tests, die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, waren in der Arbeit von Schafer et al. aber Patienten Gegenstand der Untersuchungen, die Phagozytose wurde zwei Tage vor der Operation und jeweils zwei und zehn Tage danach gemessen.

Andere Arbeitsgruppen berichteten, daß auch die in-vitro-Applikation von G-CSF die Phagozytoseleistung von Granulozyten erhöhen und Phagozytosedefekte bei HIV-Patienten und Knochenmarkempfängern rückgängig machen kann (Pitrak 1997). Rolando et al. (Rolando et al. 2000) demonstrierten in jüngerer Zeit, daß die in-vitro-Inkubation von Granulozyten mit G-CSF eine verminderte Fähigkeit zur Phagozytose wiederherstellen konnte. Sie untersuchten dazu Patienten mit akutem Leberversagen, die mit G-CSF behandelt wurden.

Damit wiesen verschiedenste Arbeitsgruppen einen positiven Einfluß von G-CSF auf die Phagozytose von Granulozyten nach. Die vorliegende Dissertation bestätigte diese Untersuchungen. Sie bewies, daß Neupogen[®] genutzt werden kann, um die Zahl der Granulozyten im peripheren Blut der Spender zu erhöhen, ohne daß die Zellen ihre Fähigkeit zur Phagozytose einbüßen.

Leukapheresezellen zeigten im Vergleich zu Zellen aus Vollblut nach G-CSF-Gabe eine schlechtere Phagozytoseleistung. Dies ließ zunächst darauf schließen, daß die Zellen durch den „Streß“, dem sie während der Apherese ausgesetzt waren, geschädigt wurden. Dieser Einfluß erwies sich allerdings als nicht statistisch signifikant. In der einfachen Auswertung wurde deutlich, daß die Zellen lediglich auf das Niveau der unstimulierten Spender zurückfallen. Dies bedeutete, daß sie insgesamt in ihrer Leistung keine nennenswerte Beeinflussung erfuhren. Die leichten Einbußen gegenüber Zellen stimulierter Spender konnten auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden: Zum einen wurden die Zellen im Konzentrat, wenn auch nur kurzfristig, in einem Medium gelagert, das dem natürlichen in keiner Weise entsprach. Das Medium, das die Granulozyten der Produkte umgab, bestand zum großen Teil aus Hydroxyethylstärke (HES), die dem Spender zur Sedimentationsbeschleunigung infundiert wurde, aus Zitrat-Lösung, die zur Antikoagulation benötigt wurde und aus Plasmabestandteilen des Spenders. Alle diese Bestandteile waren entweder als Umgebung der Granulozyten gänzlich unnatürlich oder ihre Konzentration war stark verändert. Zum anderen liegen die Zellen in den Präparaten in sehr hoher Konzentration und Dichte vor, wodurch sie ebenfalls in

Streß geraten. Auch die Adhäsion an Plastikbestandteile der Beutel kann eine gewisse Rolle spielen. Sicher beeinflußt auch die Tatsache, daß die Proben aus den Präparaten noch stärker verdünnt werden mußten als die Proben aus Vollblut nach Stimulation, die Ergebnisse aus der Leukapheresezellen. Diese Verdünnung war aber nötig, um ein ausgewogenes Verhältnis zwischen den im Kit enthaltenen FITC-*E.coli* und den Granulozyten und die genaue Zählung der Zellen im Durchflußzytometer zu gewährleisten. Die Tatsache, daß der verwendete Testkit ursprünglich für Vollblutproben konzipiert worden war, sollte ebenfalls nicht außer Acht gelassen werden, sie könnte zusätzlich zu den leicht veränderten Ergebnissen in den Konzentrationen beigetragen haben.

2.2.2 Phagozytose FITC-markierter Conidien von *Aspergillus fumigatus*

Nach den Erkenntnissen aus den ersten Versuchen mit FITC-*E.coli* wurden die Proben in dieser Versuchsreihe nur mit Medium (RPMI 1640, HEPES-gepuffert, 10% FCS) verdünnt. Die Conidien selbst waren nach Arbeitsanweisung des Herstellers (PKH2 Cell Linker Kit, Sigma, München) ebenfalls in diesem Medium markiert und gelagert worden.

Die einfache Auswertung der Ergebnisse zeigte im Fall der Conidien eine leichte Verbesserung der Phagozytose nach G-CSF-Gabe (vgl. Abb. 3). Zellen aus Aphereseprodukten lagen im Vergleich mit Zellen vor und nach Neupogen[®]-Applikation etwa bei Werten, die mit Zellen stimulierter Spender vergleichbar waren.

Nach paarweisem Vergleich konnte ebenso eine leichte Verbesserung der Phagozytose nach G-CSF detektiert werden. Zellen aus den Produkten waren z.T. etwas besser als die entsprechende Messung nach G-CSF (Meßpunkte 1 und 4; vgl. Abb. 16), z.T. etwas schlechter (Meßpunkt 2; vgl. Abb. 16). Da aber die Standardabweichungen sehr hoch waren, waren diese Ergebnisse statistisch nicht aussagekräftig.

Damit verbesserte die G-CSF-Gabe auch die Phagozytose von *Aspergillus*-Conidien, Granulozyten aus Aphereseprodukten zeigten keine oder nur sehr geringe Funktionsverluste gegenüber Zellen aus Vollblut nach Neupogen[®].

Bei dieser Versuchsanordnung sind einige kritische Punkte bedeutsam, die bei der Diskussion der Ergebnisse nicht unberücksichtigt bleiben dürfen. Die in diesem Ansatz verwendeten Conidien wurden sowohl im eigenen Labor angezüchtet als auch markiert. Damit erklären sich die relativ geringen Ausbeuten nach der Markierung. Aus der geringen Zahl an Conidien folgte, daß nicht nur die Proben nach G-CSF und aus Konzentrationen, sondern auch die Proben unstimulierter Spender verdünnt werden mußten. Proben nach G-CSF und aus den Präparaten

bedurften entsprechend ihrer hohen Zellzahl einer noch stärkeren Verdünnung als dies in den Versuchen mit FITC-*E.coli* notwendig war, um für ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Leukozyten und Bakterien zu sorgen.

Aufgrund der nach Verdünnung der Proben resultierenden geringen Zellzahlen war die Messung im Durchflußzytometer auf 1000 Zellen pro Ansatz begrenzt. Die Anzahl der untersuchten Proben insgesamt war aus technischen Gründen beschränkt. Alle diese Probleme erklären, warum in dieser Versuchsreihe insgesamt nur geringe Phagozytoseraten erzielt werden konnten. Vermutlich beeinflusste die Verwendung eines Vollbluttests und die Tatsache, daß im eigenen Labor gezüchtete und markierte Conidien benutzt wurden, die nicht zu den Bestandteilen des Testkits gehörten, diese Ergebnisse zusätzlich.

Die vorliegenden Beobachtungen deckten sich mit denen, die die Arbeitsgruppe Liles 1997 (Liles et al. 1997) veröffentlicht hatte: Auch dort steigerte die in-vivo-Applikation von G-CSF die Aktivität neutrophiler Granulozyten gegen *Aspergillus fumigatus* und *Rhizopus arrhizus*, das Killing von *Candida albicans* blieb unbeeinflusst. Auch in-vitro war dieser Effekt bereits beschrieben worden (Gaviria et al. 2001): Gaviria et al. beobachteten 2001, daß die in-vitro-Inkubation von Neutrophilen mit G-CSF die Aktivität der Zellen gegen *Fusarium solani* verbesserte. Im Rahmen dieser Dissertation konnte auf funktioneller Ebene bewiesen werden, daß die Granulozyten nach in-vivo-G-CSF-Konditionierung der Spender und nach Apherese gegenüber Conidien von *Aspergillus fumigatus* eine sehr gute phagozytotische Aktivität besaßen.

2.3 Oxidativer Burst

2.3.1 nach Stimulation mit E.coli

Die Versuchsreihe mit *E.coli* bestand wie beim Phagozytostest mit FITC-*E.coli* aus zwei Teilen: Im ersten Teil wurden die Proben nach G-CSF und aus den Produkten ebenfalls mit PBS verdünnt, im zweiten Teil erfolgte die Verdünnung mit Medium (RPMI 1640, HEPES-gepuffert, 10% AB-Serum). *E.coli* dienten in dieser Versuchsreihe als partikulärer Stimulus, d.h., sie repräsentierten bakterielle Erreger, die im Patienten Phagozyten zur Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen anregten.

Die einfache Auswertung der PBS-verdünnten Proben zeigte lediglich nach der vierten G-CSF-Applikation einen Einfluß der Spender-Konditionierung (vgl. Abb. 4a). Nach der vierten G-CSF-Gabe war der oxidative Burst im Vergleich zu Werten vor G-CSF signifikant vermin-

dert. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, daß dieser Wert auf der Untersuchung an nur vier Spendern basiert. Die Aphereseprodukte zeigten im Gegensatz dazu eine durchgängig signifikante Verminderung der Burstaktivität im Vergleich zu unstimulierten Spendern, und die Produkte eins bis drei lagen auch signifikant unter dem Wert der entsprechenden Neupogen[®]-Stimulation. Das vierte Produkt (vgl. Abb. 4a) lag im Wertebereich der übrigen Präparate, da hier die Ergebnisse der G-CSF-Stimulation aber bereits deutlich vermindert waren, ergab dieser Wert im Vergleich zur zugehörigen G-CSF-Gabe keine statistische Signifikanz.

Im paarweisen Vergleich konnte dieses Bild weiter verdeutlicht werden (vgl. Abb. 17a): Die Proben nach G-CSF-Gabe wiesen nur einen leichten bis gar keinen Rückgang der Burstaktivität (Meßpunkte 1 bis 3) auf. Klar erkennbar war hier die Ausnahme nach der vierten G-CSF-Gabe, nach der die Zellen deutlich weniger reaktive Sauerstoffverbindungen produzierten. Die Konzentrate lagen in ihrer Aktivität mit Ausnahme des vierten Präparates noch deutlich unterhalb der entsprechenden G-CSF-Stimulation, was eine weitere Verschlechterung dieser Funktion bedeutete.

Wie schon für den Fall der Phagozytosemessungen diskutiert, lag auch hier die Vermutung nahe, daß die Verdünnung mit PBS einen wesentlichen Einfluß auf die Meßergebnisse genommen hatte. Die Phagozyten müssen zur Generierung der toxischen Metaboliten, die im Zuge des respiratorischen Bursts gebildet werden, aktiviert werden. Die Herstellung dieser Metaboliten verlangt deshalb eine Aktivierung der Phagozyten, weil sie durch die Bindung von aggregierten Antikörpern an die Fc γ -Rezeptoren induziert wird (Janeway et al. 1997). Zusätzlich stellen die Bestandteile des Komplementsystems starke Aktivatoren für Phagozyten dar. Diese Punkte ließen auch in dieser Versuchsreihe den Schluß zu, daß das fehlende Serum in den verdünnten Proben die Ergebnisse zusätzlich negativ beeinflusste.

Diese Annahme wurde nach Auswertung der Medium-verdünnten Proben bestätigt: In der einfachen Auswertung wurde deutlich, daß die Granulozyten aus Proben nach G-CSF sogar eine höhere Burstaktivität zeigten als die Zellen unstimulierter Spender (vgl. Abb. 4b). Dieser Effekt hielt über alle vier G-CSF-Gaben an, die den Spendern maximal injiziert wurden. Die Apherese ließ den oxidativen Burst im Vergleich dazu wieder leicht zurückgehen (vgl. Abb. 4b), die Granulozyten zeigten aber eine mit den Zellen vor G-CSF-Gabe vergleichbare Burstaktivität. Lediglich das vierte Produkt war signifikant schlechter als die Zellen aus der vierten G-CSF-Stimulation.

Im paarweisen Vergleich ließen sich diese Ergebnisse noch offensichtlicher darstellen (vgl. Abb. 17b): Alle nach G-CSF-Gabe gemessenen Proben zeigten im Vergleich mit der unstimulierten Probe eine erhöhte Tendenz, Sauerstoffradikale zu bilden. Die Produkte lagen dann

wieder unter dem Niveau der entsprechenden Neupogen[®]-Stimulation. Besonders im paarweisen Vergleich traten allerdings sehr hohe Standardabweichungen auf.

Damit war beim oxidativen Burst nach Stimulation mit *E.coli* belegt, daß die Neupogen[®]-Stimulation der Spender keinen negativen, sondern einen leicht positiven Einfluß auf die Funktion der Zellen hatte. Die Theorie, daß G-CSF die Burstaktivität nach Stimulation mit einem zweiten Agonisten steigern kann, wurde bereits an anderer Stelle untersucht und bestätigt (Dale et al. 1995). In-vitro-Studien konnten schon in früherer Zeit den Einfluß von G-CSF auf den respiratorischen Burst belegen (Pitrak 1997), die Effekte variierten dabei aber mit den unterschiedlichen Inkubationsbedingungen. Auch in-vivo war G-CSF in der Lage, die Burstaktivität von Granulozyten zu steigern (Schafer et al. 2000): Schafer et al. beobachteten dies im Jahr 2000 in ihrer Studie an Patienten nach Oesophagektomie, die vor und bis zu sieben Tage nach dem Eingriff mit G-CSF behandelt worden waren. Die Funktion der Zellen wurde vor G-CSF-Gabe und zwei und zehn Tage danach bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit hatte auch die wiederholte Stimulation eines Spenders, hier bis zu viermal, keinen negativen Einfluß auf den durch *E.coli* ausgelösten respiratorischen Burst.

Die Untersuchung der Granulozytenpräparate ergab eine leichte Verminderung der Burstaktivität nach der Leukapherese, was ebenfalls bereits an anderer Stelle beobachtet worden war (Dale et al. 1998): Dale et al. untersuchten 1998 Zellen von Spendern, die mit Dexamethason und G-CSF konditioniert worden waren und sich 12 Stunden nach dieser Stimulation einer Apherese unterzogen. Dabei stellten sie fest, daß die Zellen aus Konzentraten stets eine schwächere Antwort auf verschiedene Stimuli des oxidativen Bursts zeigten als die nach G-CSF/Dexamethason-Stimulation getesteten Zellen. Dennoch behielten auch die Leukaphereszellen die Fähigkeit bei, signifikante Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies zu bilden. Dale et al. benutzten zur Stimulation des respiratorischen Bursts allerdings keinen partikulären Stimulus, sondern PMA, f-MLP, TNF- α oder LPS.

Der an dieser Stelle detektierte, leicht verminderte respiratorische Burst nach der Apherese muß aber nicht nachteilig für die Funktion der Zellen sein, da die Granulozyten aus den Konzentraten zwar schlechter waren als Zellen der stimulierten Spender. Sie erreichten aber Werte, die mit den Ergebnissen unstimulierter Spender vergleichbar waren. Auch in dieser Testreihe spielen sehr wahrscheinlich die kurzzeitige Lagerung der Präparate in einem für sie fremden Medium und die Verdünnung der Proben, auch mit Medium, eine gewisse Rolle. Wie bereits unter Punkt 2. Phagozytose erläutert, entsprach die Lösung, in der die Granulozyten nach der Apherese aufgefangen wurden, nicht dem normalen zellumgebenden Medium. Die Verdünnung der Proben war aus den gleichen Gründen wie beim Phagotest unumgänglich

und beeinflusste die Ergebnisse vermutlich ebenfalls, da auch der Bursttest als Vollblut-Test konzipiert ist.

2.3.2 nach Stimulation mit f-MLP

Auch zur Stimulation des respiratorischen Bursts mittels f-MLP wurden die Proben zunächst mit PBS, anschließend mit Medium (RPMI 1640, HEPES-gepuffert, 10% AB-Serum) verdünnt.

F-MLP (N-formyl-leucyl-phenylalanin) ist ein chemotaktisches Peptid, das von Bakterien gebildet wird. Dieses Peptid aktiviert neutrophile Granulozyten direkt über einen rezeptorabhängigen Mechanismus und dient als schwacher Stimulus für den oxidativen Burst (Allen et al. 1997).

PBS-verdünnte Proben zeigten in der einfachen Auswertung nach G-CSF-Gabe im Vergleich zur Probe eines unstimulierten Spenders eine erhöhte Radikalproduktion (vgl. Abb. 5a). Eine Ausnahme bildete die vierte G-CSF-Gabe, nach der die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies vermindert war. Der ansteigende Effekt war aber von der ersten bis zur dritten Stimulation sichtbar. In den entsprechenden Konzentrationen produzierten mehr Zellen Sauerstoffradikale als in unstimulierten Proben und den Proben nach G-CSF.

Im paarweisen Vergleich ist ebenfalls die erhöhte Burstaktivität der Granulozyten stimulierter Spender zu erkennen (vgl. Abb. 18a). Die Produkte wiesen hier bis zum dritten Konzentrat allenfalls eine leichte Funktionsverschlechterung auf, das vierte Produkt lag deutlich über den Werten der vierten Neupogen[®]-Stimulation.

Die einfache Auswertung Medium-verdünnter Proben ergab folgendes Bild: In Proben nach Neupogen[®]-Gabe produzierten mehr Granulozyten Sauerstoffradikale als die Zellen der unstimulierten Spender. Dieser Effekt nahm von der ersten bis zur vierten Stimulation zu. Die Konzentrate lagen etwas unterhalb der Werte stimulierter Spender (vgl. Abb. 5b). Im paarweisen Vergleich (vgl. Abb. 18a) konnte die leicht positive Tendenz der Proben nach G-CSF genauso dargestellt werden. Die Konzentrate schnitten hier zunächst etwas schlechter, im vierten Produkt aber besser ab als die Proben stimulierter Spender.

Damit belegten die Untersuchungen auch für den oxidativen Burst nach Stimulation mit f-MLP, daß weder die Konditionierung der Spender noch die Apherese negativen Einfluß auf die Funktion der Zellen nahmen. Die Erhöhung der Burstaktivität als Antwort auf die Stimulation mit f-MLP wurde auch in der Arbeit von Murea et al. beschrieben (Murea et al. 1996): Granulozyten in-vivo-G-CSF-behandelter Patienten hatten im Vergleich zu Granulozyten unstimulierter Testpersonen einen deutlich höheren oxidativen Burst. Die vorlie-

unstimulierter Testpersonen einen deutlich höheren oxidativen Burst. Die vorliegende Arbeit konnte in diesem Zusammenhang nachweisen, daß der G-CSF-Effekt über mehrere Neupogen[®]-Gaben anhielt, im Unterschied zur Arbeit von Murea et al. waren die Testpersonen die Granulozytenspender und nicht die Patienten.

In-vitro-G-CSF-Effekte auf Granulozyten beschrieben im Jahr 2000 Rolando et al. (Rolando et al. 2000): Auch in deren Untersuchungen steigerte G-CSF die Produktion von Superoxid-anionen und H₂O₂ in Granulozyten von Patienten mit akutem Leberversagen.

Auch der Rückgang der Funktion der Apheresezellen wurde zuvor schon an anderer Stelle beobachtet (Dale et al. 1998): Dale und Mitarbeiter stellten im Jahr 1998 in ihren Untersuchungen (Stimulation der Spender mit G-CSF und Dexamethason plus Apherese nach 12 Stunden) fest, daß die Leukapheresezellen eine schwächere Antwort auf verschiedene Stimuli des oxidativen Bursts, darunter auch f-MLP, zeigten als die nach Stimulation getesteten Zellen.

Der leichte Rückgang der Aktivität in den Konzentraten, der in der vorliegenden Arbeit detektiert wurde, muß wie auch im Fall der *E-coli*-Stimulation keinen negativen Effekt auf die Zellfunktion haben, da die Werte meist über den Werten unstimulierter Spender lagen. Medium, Verdünnung und die Verwendung eines Vollbluttests können hier wie bei den Versuchen mit *E.coli* als Einflußgrößen angenommen werden. Als eventuelle Ursache der verstärkten Antwort der Zellen nach G-CSF-Behandlung der Spender könnte eine Hochregulation des f-MLP-Rezeptors diskutiert werden. Diese Möglichkeit müßte aber durch weitergehende Untersuchungen bestätigt werden.

2.4 Oberflächenantigene, Aktivierungsmarker

Die Expression verschiedener Oberflächenantigene steht im Zusammenhang mit der Aktivierung der Granulozyten und nimmt Einfluß auf ihre Funktion (Stroncek et al. 1998). Die Stimulation mit G-CSF beeinflußt die Expression dieser Marker und kann somit deren Funktion verändern. So ist beispielsweise das vermehrte Erscheinen von Adhäsionsproteinen (CD11a und CD62L) auf der Oberfläche der Granulozyten ein Zeichen dafür, daß die Neutrophilen durch die Bindung chemotaktischer Stimuli aktiviert wurden (Stahl 1997). Die Hochregulation der Adhäsionsproteine stellt einen zentralen Schritt für die Leukozytenwanderung zum Infektionsherd dar (Stahl 1997). Zur Bindung der Antikörper, mit denen die in den Organismus eingedrungenen Erreger beladen werden, werden ebenfalls verschiedene Oberflächenan-

tigene benötigt (CD16, CD64). Damit spielt auch deren Regulation eine wichtige Rolle bei der Abwehr der verschiedensten Pathogene.

Die einfache Auswertung der Versuche zur Expression der Oberflächenantigene CD16, CD11a, CD62L und CD64 ließ eine Herunterregulation sämtlicher Marker nach der G-CSF-Stimulation der Spender (vgl. Abb. 6) erkennen. Besonders auffällig war dies im Fall der Antigene CD11a und CD62L, der beiden Adhäsionsproteine, da diese auf Granulozyten unstimulierter Spender zu einem hohen Prozentsatz exprimiert wurden. Die Herunterregulation von CD16 und CD62L nach G-CSF-Gabe ist eine bereits weit verbreitete Erkenntnis (Klein et al. 1997), auch die Downregulation von CD11a nach G-CSF wurde bereits an anderer Stelle beschrieben (Stroncek et al. 1998). Im Gegensatz zu früheren Berichten (Liles et al. 1994; Dale et al. 1995; Stroncek et al. 1998; Dale et al. 1998) konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings kein Anstieg der Expression von CD64 festgestellt werden.

Im paarweisen Vergleich (vgl. Abb. 19) ergab sich das gleiche Resultat: In nahezu allen Fällen wurden die Marker nach Neupogen[®]-Gabe herunterreguliert, wiederum besonders deutlich sichtbar bei der Untersuchung von CD11a und CD62L. Die extreme Herunterregulation dieser beiden Marker beim Vergleich der vierten G-CSF-Gabe mit unstimulierten Spendern (Meßpunkt 4) muß vorsichtig interpretiert werden, da das Ergebnis auf jeweils nur einem Wertepaar basiert.

Die Ergebnisse aus den Konzentraten ließen in der einfachen Auswertung erkennen, daß sämtliche Marker wieder hochreguliert wurden (vgl. Abb. 6). Die Expression der Oberflächenmarker in den Produkten stieg dabei im Fall von CD11a und CD62L wieder auf das Niveau der Granulozyten unstimulierter Spender an. Im Fall von CD16 und CD64 konnte zum Teil sogar ein Anstieg der Marker beobachtet werden, der die Ergebnisse auf Neutrophilen unstimulierter Spender übertraf.

Im paarweisen Vergleich der Konzentrate mit den Werten der korrespondierenden G-CSF-Stimulation konnte dieser Anstieg ebenfalls bestätigt werden (vgl. Abb. 19).

In der Vergangenheit vertraten verschiedene Forscher die Meinung, daß Zellen G-CSF-stimulierter Spender aufgrund der Herunterregulation der Rezeptoren CD11a und CD62L weniger stark an Endothelzellen adhäreren könnten und daher die Gefahr geringer sei, daß im Patienten gefährliche pulmonale Reaktionen auftreten (Stroncek et al. 1998). Durch die Downregulation dieser beiden Marker wären sowohl Rolling und Adhäsion als auch die festere Anhaftung der Granulozyten ans Endothel, also wichtige Schritte zur Wanderung der Zellen, vermindert (siehe auch Einleitung Teil 2.3). Die hier vorgelegten Ergebnisse widersprechen dieser Theorie, da die dem Patienten transfundierten Granulozyten aus den Konzentraten

die Marker wieder hochreguliert hatten. Dies dürfte aber keine erhöhte Gefahr für den Patienten darstellen, da die Werte lediglich auf das Niveau unstimulierter, gesunder Spender, also quasi auf „Normalwerte“ anstiegen. Für den Spender selbst könnte die Herunterregulation nach G-CSF allerdings von Vorteil sein, da auch in seinem Organismus die Zellen weniger adhären sind.

Die Herunterregulation der Oberflächenantigene CD16 und CD64, die beide mit unterschiedlicher Avidität IgG binden, nach G-CSF bedeutete für die Zellen, daß sie weniger Immunglobuline und damit beladene Keime binden konnten. Aber auch hier exprimierten Apheresezellen beide Marker wieder so stark wie Zellen unstimulierter Spender, z.T. übertrafen sie diese Werte sogar. Damit erreicht die Bindungskapazität der Granulozyten aus den Produkten ebenfalls wieder Normalniveau.

Die vorliegenden Untersuchungen belegten, daß die Zellen durch in-vivo-G-CSF-Gabe die wichtigen Oberflächenantigene CD16, CD11a, CD62L und CD64 herunterregulierten. Durch die Apherese erfuhren die Zellen eine Aktivierung, die mit einer wieder vermehrten Antigenexpression einherging. Die Hochregulation überstieg aber nur zum Teil die Werte, die von unstimulierten Spendern vorgelegt worden waren.

2.5 Zytokine

In dieser Versuchsreihe wurden verschiedene Zytokine, die im Zuge einer Entzündungsreaktion gebildet werden, analysiert. Ziel war es dabei, festzustellen, ob mit dem Konzentrat große Mengen dieser Zytokine an den Patienten weitergegeben werden, die für diesen eine Gefahr darstellen könnten. Dies war von Bedeutung, da große Mengen an IL-1 β und IL-6 in Thrombozytenkonzentraten gefunden worden waren, die Leukozyten enthielten (Heddle et al. 1994; British Committee for Standards in Hematology 1998). Diese Zytokine wurden mit fieberhaften Transfusionsreaktionen in Zusammenhang gebracht. Die Reaktionen auf die Thrombozytenkonzentrate korrelierten mit dem IL-6- und IL-1 β -Gehalt im Plasma, das in den Konzentraten enthalten war. Die Konzentration an diesen beiden Zytokinen nahm mit der Lagerdauer zu und korrelierte ihrerseits mit der in den Thrombozytenkonzentraten enthaltenen Menge an Leukozyten.

Für die Fragestellung der vorliegenden Dissertation war zusätzlich von Interesse, ob und wenn ja inwieweit die Zellen durch G-CSF und/oder Apherese zur Zytokinproduktion angeregt werden. Dazu wurden die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α im Plasma der Spender vor und nach G-CSF-Stimulation sowie im Produkt untersucht. Aufgrund dieser Versuchs-

ordnung war es möglich, daß die gemessenen Zytokine auch aus anderen im Vollblut bzw. dem Konzentrat enthaltenen Zellen stammen konnten.

Weder in den Plasmen der Spender vor und nach G-CSF noch in den Produktüberständen waren nennenswerte Mengen an IL-1 β , IL-6 oder TNF- α nachweisbar (vgl. Ergebnisteil, Tabellen 3 und 4). Sowohl die einfache als auch die Auswertung mittels paarweisem Vergleich kamen zu demselben Ergebnis. Die gemessenen Zytokine sind durch künstliche Infektion oder LPS induzierbar und können danach in bis zu mehreren tausend Pikogramm detektiert werden (Neumeister et al. 1998). Mit der vorliegenden Arbeit wurde deutlich, daß weder die Neupogen[®]-Gabe noch die Apherese die Zellen zur Produktion dieser Zytokine anregten.

Ein etwas anderes Bild zeigte sich nach der Auswertung der IL-8-Bestimmung in den Plasmen und den Produkten: Während in den Plasmen der Spender nach G-CSF-Gabe nahezu die gleichen Mengen an IL-8 detektiert wurden wie in Plasmen unstimulierter Spender, lagen in den Produktüberständen erhöhte IL-8-Konzentrationen vor (vgl. einfache Auswertung Abb. 7).

Im paarweisen Vergleich wurde dieses Ergebnis noch deutlicher (vgl. Abb. 20): Proben nach G-CSF enthielten etwa gleich viel oder etwas weniger IL-8 als Proben der unstimulierten Spender. Vergleich man dagegen die Produkte mit den entsprechenden Plasmen nach G-CSF-Gabe, so wurden dort erhöhte IL-8-Mengen gemessen. Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, daß die Granulozyten durch die Apherese aktiviert wurden und mit der Produktion von IL-8 begannen. Die erhöhten IL-8-Konzentrationen konnten aber auch darin begründet liegen, daß im Konzentrat sehr viele Granulozyten pro Volumeneinheit enthalten waren. Zum einen versetzte dies die Zellen in „Streiß“. Zum anderen war damit die Zellkonzentration im Präparat so hoch, daß pro Volumeneinheit sehr viele, sehr dicht gepackte Zellen vorhanden waren, die IL-8 bilden konnten.

Letztendlich war aber auch die IL-8-Konzentration in den Aphereseprodukten nicht hoch genug, um fieberhafte Reaktionen beim Patienten auslösen zu können. Erreger, die den Organismus befallen, sind in der Lage, die IL-8-Produktion um ein vielfaches ansteigen zu lassen (Engel et al. 1994; Neumeister et al. 1998). Die in dieser Arbeit detektierten Mengen lagen aber weit unter diesen Konzentrationen.

Mit der Transfusion der Präparate wurden also keine für den Patienten gefährlichen Mengen an Zytokinen übertragen. Damit waren und sind für die Zukunft keine durch Zytokine ausgelösten fieberhaften Transfusionsreaktionen zu erwarten.

2.6 Stimulus-Response-Coupling (LTB₄-Produktion)

LTB₄ ist ein wichtiger Mediator der Granulozytenfunktion. Wie bereits beschrieben (siehe Einleitung, Punkt 2.4) werden Granulozyten durch infektiöse Agentien zur LTB₄-Produktion angeregt. Dies lockt andere Zellen an und stimuliert deren verschiedenen Funktionen (Jane-way et al. 1997). Damit zählt LTB₄ zu den wichtigsten intrazellulären Mediatoren der chemotaktischen Signal-Amplifikation (Lane et al. 1988).

Nach G-CSF-Gabe konnte keine vermehrte LTB₄-Produktion gemessen werden (vgl. einfache Auswertung, Abb. 8). Die Zellen aus den Konzentraten zeigten einen leichten, aber nicht signifikanten Rückgang der LTB₄-Produktion. Im paarweisen Vergleich (vgl. Abb. 21) war deutlich erkennbar, daß die Produktion dieses Mediators weder durch die Neupogen[®]-Stimulation der Spender noch durch die Apherese nennenswert beeinflusst worden war. Die großen Abweichungen im vierten Produkt, die sowohl in der einfachen als auch in der Auswertung über den paarweisen Vergleich auffielen, lassen aufgrund der geringen Fallzahlen und der Standardabweichungen nur eine vorsichtige Interpretation zu.

Damit wies diese Arbeit nach, daß die Fähigkeit der Granulozyten zum Stimulus-Response-Coupling weder durch G-CSF noch durch Leukapherese signifikant beeinflusst wurde. Zum einen ließ sich damit feststellen, daß die Zellen hinsichtlich dieser Funktion keinen Schaden erlitten. Zum anderen widersprach dieses Ergebnis aber verschiedenen anderen Arbeitsgruppen, die ebenfalls LTB₄-Produktion unter G-CSF-Einfluß untersucht hatten: G-CSF konnte in einer Versuchsreihe von Hensler et al. die Calcium-Ionophor induzierte LTB₄-Produktion deutlich erhöhen (Hensler et al. 1994). In einer anderen Arbeit steigerte die tägliche G-CSF-Behandlung HIV-infizierter Patienten (300 µg über 5 Tage) die reduzierte Fähigkeit der Zellen, LTB₄ zu generieren (Coffey et al. 1998). Mit diesem Ergebnis korrelierte die Verbesserung der fungistatischen Wirkung der Zellen auf *Cryptococcus neoformans*, einem typischen opportunistischen Erreger bei HIV-infizierten Patienten. Das abweichende Ergebnis in der hier vorliegenden Arbeit lässt vermuten, daß die Regulation der LTB₄-Produktion in den gesunden Granulozytenspendern auf anderem Wege abläuft als in den infizierten Patienten, in deren Granulozyten die LTB₄-Synthese krankheitsbedingt um ein vierfaches reduziert ist.

Die Tatsache, daß die Ergebnisse der Präparate mit Zellen vor und nach G-CSF-Gabe vergleichbar waren, bewies, daß die Zellen auch in dieser Funktion weder durch G-CSF-Gabe noch durch Apherese einen Schaden erlitten.

3. Funktionstests bei Empfängern

Ziel der Granulozytentransfusion war stets die Therapie der Neutropenie oder die Infektionsprophylaxe beim Patienten. Damit mußten die Funktionen der Zellen nicht nur über die Stimulation der Spender und die Apherese hinweg, sondern vorrangig und vor allem im Patienten erhalten sein. Um sicherzugehen, daß die Funktionstüchtigkeit der Zellen, wie sie über den Gewinnungsprozeß bestätigt werden konnte, auch im Patienten gewährleistet war, wurden den Patienten acht Stunden nach der Transfusion Blutproben entnommen. In diesen Proben wurden ebenfalls Funktionstests an den Granulozyten durchgeführt. Da die Patienten aufgrund ihres Krankheitsbildes und der Indikation zur Granulozytentransfusion (siehe Material und Methoden, Kap. Studiendesign) nur sehr wenige Granulozyten im Blut aufwiesen, konnten nicht alle Funktionstests durchgeführt werden. Alle diejenigen Untersuchungen, die die Isolation größerer Mengen an Neutrophilen erforderten (Chemotaxis-Assays, LTB₄-Bestimmung), wurden daher mit Patientenproben nicht unternommen. Ebenfalls unterlassen wurden Tests zum Zytokingehalt der Patientenplasmen, da sie keinen Beitrag zur Fragestellung liefern konnten. Die Patienten, die beispielweise Infektionen entwickelt hatten, produzierten aus diesem Grund bereits Zytokine, so daß auf einen Einfluß der Transfusionen keinerlei Rückschlüsse möglich gewesen wären.

Aufgrund der besseren Übersicht sollten auch hier die einfache und die Auswertung mittels paarweisem Vergleich gemeinsam diskutiert werden.

Die Patientenproben wurden immer unverdünnt gemessen, eine Verdünnung war aufgrund des geringen Zellgehalts nicht notwendig.

Bei der Messung der Patientenproben wurde angenommen, daß die getesteten Zellen alle Granulozyten aus der Transfusion waren. Aufgrund der zu hohen Belastung, die eine solche Untersuchung für die Patienten mit sich gezogen hätte, konnten die zu transfundierenden Zellen nicht markiert werden, um ihre Herkunft eindeutig zu belegen. Da aber die Patienten nur sehr wenige bis gar keine eigenen Granulozyten produzierten und im Blut aufwiesen (vgl. Material und Methoden, Kap. Studiendesign, Indikationen für Granulozytentransfusion), war die vereinfachte Annahme, alle gemessenen Zellen sind transfundierte Zellen, legitim. Die Granulozytenzahl im Blut der Patienten stieg von unter 50 Zellen/ μ l auf durchschnittlich 420 Granulozyten/ μ l (Range 220-3440) nach der Transfusion an.

Die Diskussion der Ergebnisse aus den Patientenproben basiert auf dem Vergleich der Patientenergebnisse mit Ergebnissen aus Spenderproben und Konzentraten. Bei der einfachen Auswertung können die Daten der Patienten sowohl mit den PBS- als auch mit den Medium-

verdünnten Spenderproben und Konzentraten verglichen werden. Dazu wird im Text auf die entsprechenden Graphiken hingewiesen.

Beim paarweisen Vergleich der Patienten mit den Werten aus Spendern und Konzentraten konnte nur auf die PBS-verdünnten Proben zurückgegriffen werden, da nur für diese die Datenmenge zur Paarbildung ausreichend war.

3.1 Phagozytose

3.1.1 Phagozytose FITC-markierter E.coli

Nachdem die Phagozytose weder durch G-CSF noch durch die Apherese negativ beeinflusst worden war, bestätigte sich die Funktionstüchtigkeit der Zellen in den Patientenproben. Nach einfacher Auswertung konnte gezeigt werden, daß die Zellen in den Proben von Patienten ebenso gut die FITC-*E.coli* phagozytierten wie die Zellen konditionierter Spender und die Konzentrate (Medium-verdünnte Spenderproben und Konzentrate: vgl. Abb. 9 und Abb. 2b). Der Anteil an Zellen, die FITC-*E.coli* phagozytierte, betrug bei den Patienten zwischen 45 und 60%. Damit lagen die Zellen in den Patientenproben im einfachen Vergleich über den Werten unstimulierter Spender (ca. 40%), waren mit den Werten stimulierter Spender vergleichbar (um 60%) und erzielten meist höhere Werte als die Produkte (ca. 20 bis 50%).

Im einfachen Vergleich der Patientenwerte mit PBS-verdünnten Proben lagen die Ergebnisse der Patienten auf vergleichbarem Niveau wie die Ergebnisse der G-CSF-behandelten Spender (vgl. Abb. 9 und Abb. 2a). Sie schnitten also etwas schlechter als die unbehandelten Spender ab (ca. 70%), es phagozytierten aber deutlich mehr Granulozyten aus den Patientenproben als aus den Konzentraten.

Im paarweisen Vergleich der Patientenwerte mit den Spendern nach G-CSF (PBS-Verdünnung) und den Konzentraten (PBS-Verdünnung) zeigte sich noch deutlicher, daß die volle Funktionstüchtigkeit der Zellen erhalten blieb (vgl. Abb. 22):

Die Werte, die mittels Granulozyten aus Patientenproben nach Transfusion ermittelt wurden, waren mit Ausnahme des Meßpunktes 3 immer gleichauf mit oder höher als die Werte der G-CSF-stimulierten Spender. In allen Fällen war der Anteil der phagozytierenden Zellen in den Patientenproben deutlich größer als dies bei den PBS-verdünnten Konzentraten der Fall war.

Diese Ergebnisse dokumentierten den Erhalt der vollen Funktionstüchtigkeit der transfundierten Zellen. Die Tatsache, daß die Phagozytosefähigkeit der Granulozyten im Patienten im Vergleich zu den Konzentraten wieder regeneriert schien, bestätigte die Annahme, daß so-

wohl die Verdünnung der Proben als auch die Lagerung im Beutel sowie das für eine Vollblutprobe konzipierte Testsystem Einfluß auf die Ergebnisse in den Konzentraten hatte.

Die Granulozyten, die übertragen wurden, waren in der Lage, eventuell vorhandene Krankheitskeime zu phagozytieren. Sie konnten also eine sehr wichtige Funktion in der Abwehr von Pathogenen wahrnehmen, die dem Patienten aufgrund seines neutropenischen Zustandes fehlte. Damit macht die Applikation der Zellen zur Bekämpfung der Infektionen im Patienten Sinn.

*3.1.2 Phagozytose FITC-markierter Conidien von *Aspergillus fumigatus**

Wie bereits im Ergebnisteil erläutert, konnte die Phagozytose der Conidien aufgrund der Datenlage nicht mittels paarweisem Vergleich erfolgen.

Verglich man die Resultate der Patienten mit den Ergebnissen der Spender und der Konzentrate in der einfachen Auswertung, so waren folgende Schlußfolgerungen möglich:

Die Granulozyten, die den Patienten übertragen worden waren, phagozytierten die Conidien in ähnlichem Maß wie Zellen stimulierter Spender und Zellen aus den Konzentraten (vgl. Abb. 10 und Abb. 3). Damit war die Anzahl der phagozytierenden Zellen in Proben der Patienten höher als in den Proben der unstimulierten Spender. Die detektierte Steigerung der Zahl phagozytierender Zellen nach G-CSF und in den Konzentraten ließ sich also in den Patienten bestätigen. Auch in dieser Funktion hatten die Zellen damit keinerlei Verluste erlitten. Bei der Beurteilung der Ergebnisse war allerdings die geringe Datenmenge, vor allem nach der zweiten und dritten Transfusion zu beachten, dort stammen die Werte von jeweils nur einem Patienten.

3.2 Oxidativer Burst

*3.2.1 Stimulation mit *E.coli**

Die Ergebnisse der Versuche zum oxidativen Burst nach Stimulation mit *E.coli* lieferten ebenfalls Beweise für die Funktionstüchtigkeit der applizierten Zellen:

Verglich man in der einfachen Auswertung Proben der Patienten mit PBS-verdünnten Spenderproben und Konzentraten, so war erkennbar, daß die Granulozyten aus den Patienten anfangs Werte lieferten, die mit den Proben nach G-CSF vergleichbar waren (vgl. Abb. 11 und 4a). Von der ersten zur vierten Transfusion nahm die Anzahl der Zellen, die Sauerstoffradikale bildeten, aber leicht ab und blieb dann unter den Werten der Proben nach Neupogen®-

Gabe. Die Ergebnisse lagen aber stets über denjenigen, die in den Konzentraten ermittelt worden waren. Im Vergleich mit Medium-verdünnten Proben (vgl. Abb. 11 und Abb. 4b) zeigten die Granulozyten aus den Patientenproben eine deutlich geringere Radikalproduktion. Auch die Produkte lagen nach Medium-Verdünnung über den Werten der Patienten.

Im paarweisen Vergleich wurden diese Beobachtungen bestätigt (vgl. Abb. 23): In den Patientenproben produzierten weniger Granulozyten Radikale als in den (PBS-verdünnten) Proben der stimulierten Spender, während die PBS-verdünnten Konzentrate schlechtere Ergebnisse lieferten.

Interessant war in dieser Auswertung auch die scheinbar fortschreitende Abnahme der Funktion von der ersten zur vierten Transfusion: nach der vierten Granulozytentransfusion lieferten die Patientenproben nur noch Werte, die im paarweisen Vergleich kaum noch über denen der Produkte lagen (vgl. Abb. 23). Auch in der einfachen Auswertung der Patientenproben ließ sich dieser Verlauf feststellen (vgl. Abb. 11). Offen blieb dabei die Frage nach der Ursache. Möglich war zum einen, daß die Granulozyten nach der mehrfachen Stimulation der Spender leicht zu Schaden kommen. Dem widersprachen jedoch die Untersuchungen nach G-CSF-Gabe und in den Konzentraten (vgl. Abb. 4a und b), die lediglich der PBS-Verdünnung, nicht aber der G-CSF-Stimulation oder der Apherese einen Einfluß auf die Zellfunktion zusprachen.

Zum anderen müssen die relativ hohen Standardabweichungen beachtet werden, die die Aussagekraft dieser Beobachtung relativieren.

3.2.2 Stimulation mit f-MLP

Nach Stimulation mit f-MLP produzierten nur wenige Zellen aus Patientenproben reaktive Sauerstoffverbindungen (einfache Auswertung, vgl. Abb. 12). Die Ergebnisse lagen dabei zwischen 0 und 5%, dies war mit den Werten der unstimulierten Spender vergleichbar (vgl. Abb. 5a und b). Die Werte der Patienten lagen damit unter denjenigen, die Granulozyten nach G-CSF oder Granulozyten aus Konzentraten erreichten, unabhängig von der Probenverdünnung. Damit wurde der positive Effekt, den G-CSF auf die Granulozyten hatte, wieder aufgehoben. Es ließen sich so zwar weniger Zellen zum respiratorischen Burst anregen als in Spenderproben nach G-CSF oder Konzentraten, dennoch bedeutete dies keinen völligen Funktionsverlust, da die Werte immer noch mit Ergebnissen unstimulierter Spender vergleichbar waren.

Die bereits in der Auswertung der Spender- und Konzentratproben erwähnte Regulation der Rezeptordichte konnte auch hier relevant sein. Es besteht die Möglichkeit, daß die zuvor hochregulierten f-MLP-Rezeptoren wieder auf normales Maß herunterreguliert wurden. Dies bliebe aber durch weitere Untersuchungen zu bestätigen.

3.3. Oberflächenantigene, Aktivierungsmarker

In der einfachen Auswertung der Oberflächenantigene bei Patientenproben zeigte sich, daß alle vier untersuchten Marker im Vergleich zur bei Produkten detektierten Expression wieder auf sehr viel niedrigere Werte zurückgingen (vgl. Abb. 13 und Abb. 6a bis d). Das bedeutet, die deutliche Hochregulation der verschiedenen Adhäsions- und IgG-Bindeproteine auf Granulozyten der Konzentrate wurde wieder normalisiert. Zum Teil lagen die Werte aus den Patientenproben sogar unter denjenigen, die auf Granulozyten stimulierter Spender gemessen wurden. Das wiederum heißt, daß die Ergebnisse noch weiter unter die bereits herunterregulierten Werte der Granulozyten nach G-CSF absanken.

Eindrucksvoll erkennbar wurden diese Beobachtungen in der Auswertung über den paarweisen Vergleich (vgl. Abb. 25): Im Vergleich der Patientenwerte mit der entsprechenden G-CSF-Stimulation des Spenders zeigten sich z.T. deutliche Herunterregulationen der einzelnen Marker, obwohl schon die G-CSF-Stimulation in den Spendern eine solche Herunterregulation verursacht hatte. Noch gravierender waren die Unterschiede im paarweisen Vergleich mit den Produkten: Da die Granulozyten aus den Konzentraten, wie bereits beschrieben, die Oberflächenantigene stark hochreguliert hatten, fiel die Abweichung der Patientendaten hier besonders stark aus.

Bei der Diskussion der Ergebnisse bleibt aber zu beachten, daß besonders für den paarweisen Vergleich nur eine kleine Datenmenge vorlag, die zur Auswertung herangezogen werden konnte.

Die in den Patienten ermittelten Werte lassen verschiedene Punkte zur Diskussion zu: Wie bereits angesprochen, wurde in früheren Arbeiten die Theorie vertreten, die Herunterregulation der Marker nach G-CSF-Gabe könnte für den Patienten von Nutzen sein, da die Zellen eventuell weniger stark an das Endothel adhären (Stroncek et al. 1998). Die Ergebnisse, die die Auswertung der Produkte ergeben hatte, widersprachen dieser Theorie, da die Zellen in den Konzentraten diese Oberflächenantigene stark hochreguliert hatten (siehe oben). Damit schienen die Apheresezellen durch den Prozeß der Gewinnung aktiviert zu sein. Dennoch ließen die Ergebnisse nicht den Schluß zu, daß die Zellen für den Patienten eine Gefahr dar-

stellten, denn die Antigene wurden nur auf das Maß der unstimulierten Zellen hochreguliert. Nach den Messungen an transfundierten Zellen, die dem Patienten entnommen worden waren, zeigte sich nun eine erneute Herunterregulation dieser Werte auf ein Maß, das am ehesten mit Zellen der konditionierten Spender vergleichbar war. Damit war die Theorie, daß diese Verminderung der Markerexpression die Empfänger schützen könnte, wieder gegeben. Für diese Theorie sprächen dabei nicht nur die im Empfänger detektierten Ergebnisse, sondern auch die Tatsache, daß in keinem der Patienten, deren Daten in diese Arbeit einfließen, unerwünschte pulmonale Nebenwirkungen beobachtet werden konnten. Trotz der Herunterregulation der IgG-Bindungsproteine (CD16 und CD64) konnte aber auch nachgewiesen werden, daß Phagozytose und oxidativer Burst nach der Transfusion normal funktionierten.

4. PCR, GAT, GIFT und MAIGA

4.1 PCR zur Typisierung granulozytärer Antigene

Die Polymerase-Kettenreaktion stellt eine bereits weit verbreitete Methode zur Amplifizierung bestimmter DNA-Abschnitte dar. Die in dieser Arbeit angewendete Methode wurde als bewährtes Testsystem übernommen (mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe Bux, Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Gießen).

Mit der PCR bestand die Möglichkeit, schnell ein Screening an gesunden Spendern durchzuführen, um typisierte Granulozyten für die Bestimmung eventuell im Patientenserum vorhandener Antikörper zu erhalten.

So ließen sich einfach und schnell mehrere freiwillige gesunde Spender identifizieren, die als Vergleichspersonen in Frage kamen. Im MAIGA (siehe Abschnitte unten und „Material und Methoden“) wurden dabei immer Zellen eines heterozygoten Spenders (NA1/NA2) und eines homozygoten Spenders (NA1/NA1 oder NA2/NA2) verwendet, um granulozytäre Antikörper im Patientenserum zu identifizieren. Reagierte das Patientenserum im MAIGA mit Granulozyten beider Spender, so mußten beide Arten Antikörper im Serum vorliegen, reagierte der Patient mit nur einem der Spender, konnte per Ausschlußverfahren der entsprechende Antikörper identifiziert werden.

4.2 Granulozyten-Agglutinationstest (GAT)

Im Agglutinationstest wurden die Granulozyten der Spender und der resultierenden Konzentrate mit Serum der Spender inkubiert. Lagen im Patientenserum Antikörper vor, die sich gegen die Granulozyten des Spenders und/oder des Konzentrates richteten, so kam es zur Agglutination, die Zellen und die Antikörper verklumpten. Wie bereits unter „Material und Methoden“ erwähnt, sprach der GAT aber auch an, wenn im Patientenserum HLA-Antikörper gegen Zellen der Spender vorlagen. Um dies zu berücksichtigen, wurde gleichzeitig ein Lymphocytotoxizitätstest (LCT) durchgeführt. Dieser Test wurde von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Wernet durchgeführt und fiel in allen Fällen negativ aus.

Der GAT wurde durchgeführt, um zunächst grundsätzlich abzuklären, ob im Serum der Patienten Antikörper vorlagen, die mit den Spenderzellen reagieren. Da solch eine Reaktion mit der Expression des entsprechenden Antigens auf der Zelloberfläche zusammenhängt, wurden nicht nur die isolierten Granulozyten des Spenders vor und nach der Neupogen[®]-Gabe, sondern auch die Leukapheresezellen gegen das Patientenserum getestet. Nicht nur die G-CSF-Stimulation der Spender, sondern auch die Apherese können, wie bereits im Fall der Aktivierungsmarker bewiesen (siehe oben), die Expression der Antigene auf der Zelloberfläche beeinflussen.

Insgesamt wurde der GAT 27 mal durchgeführt. Untersucht wurden Seren von drei verschiedenen Patienten und Zellen von sechs unterschiedlichen Spendern. Ein Patient erhielt Granulozyten von drei Spendern.

Insgesamt konnten nur 3 einzelne Fälle von Crossreaktivität des Patientenseras mit Granulozyten im GAT detektiert werden. Dabei reagierten die Seren aller untersuchten Patienten (n=3) einmal. Der Patient, der von drei Spendern Zellen erhielt, reagierte mit nur einem Spender. Da alle auf HLA-Antikörper getesteten Seren im LCT negativ reagierten, lag die Vermutung nahe, daß hier granulozytäre Antikörper gebildet worden waren. Für die Bildung von Antikörpern sprach ebenfalls die Tatsache, daß die Reaktion in zwei Fällen erst vor der zweiten Transfusion zu sehen war, der Körper des Patienten also genug Zeit zur Verfügung hatte, um Antikörper zu bilden. Im dritten Fall trat die Agglutination allerdings bereits vor der ersten Transfusion auf. Bei diesem Patienten handelte es sich um eine Frau, die eventuell bei vorangegangenen Geburten etc. durch Transfusionen immunisiert worden war. In allen Fällen reagierten die Patientenserum sowohl mit Zellen der Spender nach G-CSF/vor Apherese als auch mit Zellen aus den Produkten. Somit wurde die Reaktion in keinem Fall durch erhöhte Antigenexpression der Konzentratzellen hervorgerufen. Da bereits in früheren Arbeiten eine

relativ hohe Inzidenz an granulozytären Antikörpern bei Granulozytenempfängern beschrieben worden war (Stroncek et al. 1993; Stroncek et al. 1996), mußte nun geklärt werden, ob tatsächlich granulozytäre Antikörper vorlagen oder Antikörper anderer Genese. Dazu wurde der im folgenden diskutierte Granulozyten-Immunfluoreszenz-Test durchgeführt.

4.3 Granulozyten-Immunfluoreszenz-Test (GIFT)

Im GIFT können im Serum vorliegende Antikörper mit den Spenderzellen reagieren und werden dann, unabhängig von ihrer Spezifität, detektiert. Dies ist möglich, weil in diesem Testsystem zur Detektion gebundener Antikörper ein Anti-IgG-Antikörper, der FITC-markiert ist, eingesetzt wird. Dieser markierte Anti-Antikörper bindet an die Gamma-Kette des Immunglobulins und zeigt so gebundenes IgG an. Um die Auswertung des Versuches zu objektivieren und Fehler durch die visuelle Auswertung unter dem Mikroskop auszuschließen, wurden die Anteile an FITC-positiven Zellen mittels Durchflußzytometer bestimmt. Damit war zugleich eine Abstufung der positiven Reaktionen möglich, da der prozentuale Anteil an FITC-positiven Zellen, also der Anteil derjenigen Zellen, die auf der Oberfläche IgG gebunden hatten, ausgerechnet werden konnte.

Der GIFT wurde insgesamt 17 mal durchgeführt, alle im GAT als positiv aufgefallenen Proben waren in die Testreihe eingeschlossen. Lediglich in einem Fall konnten hier positive Reaktionen detektiert werden. Ein Patientenserum reagierte mit den Zellen aus dem Granulozytenkonzentrat, nicht aber mit den isolierten Zellen des Spenders vor der Apherese. Das positiv getestete Serum hatte zuvor auch im GAT Zellen des Spenders zur Agglutination gebracht (Fall 2: Patientenserum/Granulozyten nach 2. G-CSF-Gabe und Granulozyten aus dem zweiten Konzentrat). Der Patient wurde insgesamt mit Zellen von drei verschiedenen Spendern transfundiert und reagierte im GIFT mit Zellen aus dem zweiten Produkt des zweiten Spenders. Er reagierte weder mit Zellen des ersten noch mit Zellen des dritten Spenders.

Die positive Reaktion fiel sehr schwach aus (3,05% positive Zellen). Damit schienen in diesem Patientenserum zumindest schwache granulozytäre Antikörper vorzuliegen, die mit den Konzentratzellen reagierten. Die Reaktion fand aber nicht mit Zellen statt, die aus dem Spendervollblut nach G-CSF gewonnen worden waren. Möglicherweise exprimierten die Zellen nach der Apherese vermehrt denjenigen Rezeptor, an den der entsprechende, noch nicht näher identifizierte Antikörper binden konnte. Um die Spezifität dieses vermuteten Antikörpers zu bestimmen wurde diese, sowohl im GAT als auch im GIFT positive Probe im MAIGA auf den Typ des vorliegenden Antikörpers getestet.

4.4 Monoclonal antibody specific immobilization of granulocyte antigens (MAIGA-Assay)

Der nach GAT und GIFT vorliegende Verdacht, daß im Serum dieses Patienten granulozytäre Antikörper vorlagen, sollte im MAIGA geklärt werden. Dies war aus dem Grund relevant, da diese Antikörper für Lungenkomplikationen verantwortlich gemacht und im Zusammenhang mit dem Auftreten der transfusionsassoziierten Lungeninsuffizienz gebracht wurden (Schiffer 1983; Popovsky 1983; Clift et al. 1984).

Die transfusionsassoziierte Lungeninsuffizienz (*Transfusion-Related Acute Lung Injury*, TRALI) tritt innerhalb weniger Stunden nach einer Bluttransfusion auf und zeigt als Leitsymptom eine schnell zunehmende Dyspnoe (Bux et al. 1994). Der Thorax zeigt zusätzlich im Röntgenbild beidseitige Infiltrate, wie sie beim Lungenödem beobachtet werden können. Die Letalität wird in der Literatur mit 5% angegeben, bei einer Inzidenz von 0,02% (Bux et al. 1994). Diese Beobachtungen und die Kenntnis, daß die meisten fieberhaften Reaktionen, die nach einer Erythrozyten-Transfusion auftreten, durch Antikörper verursacht werden, die sich gegen im Präparat enthaltene Leukozyten richten (Schiffer 1983), zeigten, wie wichtig die Identifizierung granulozytärer Antikörper ist. Einige ältere Quellen sprachen es HLA-inkompatiblen Granulozyten zu, daß das Recovery in den transfundierten Patienten niedriger ausfiel als erwünscht (Huestis 1982). Aufgrund der damaligen Datenlage (viele Variablen, wie z.B. Grunderkrankungen der Patienten, geringe Ausbeute bei der Granulozytengewinnung etc.) müssen diese Aussagen aber vorsichtig bewertet werden. Auch dies war aber ein Grund, weshalb die Rolle der Antikörper weiter untersucht werden mußte. Wichtig war es außerdem, zwischen der Transfusion inkompatibler Granulozyten und der Sensibilisierung der Patienten gegen die Spenderzellen zu unterscheiden (Clift et al. 1984). Sensibilisierte Patienten zeigten verstärkt unerwünschte Nebenwirkungen und die Granulozyten waren in ihrer Funktion im Patienten eingeschränkt.

Nach den Untersuchungen im GAT und GIFT wurde das auffällige Serum im MAIGA auf die Antigenpezifität des vermuteten Antikörpers untersucht. Bei der positiven Probe handelte es sich um das Serum des Patienten, der mit Granulozyten verschiedener Spender versorgt wurde. Weder in der ersten Testreihe noch in der Wiederholung des Assays konnten granulozytäre Antikörper detektiert werden. Das Patientenserum wurde in beiden Ansätzen sowohl mit Granulozyten eines NA2/NA2 homozygoten als auch mit Granulozyten eines NA1/NA2 heterozygoten Spenders inkubiert. Im Patientenserum lagen also weder Antikörper, die sich gegen HNA-1 richteten, noch Antikörper, die sich gegen HNA-2 richteten vor. Damit waren die beiden wichtigsten Antikörper (Bux et al. 1992) ausgeschlossen. Die positive Reaktion im

GIFT (s.o.) konnte somit nicht durch Antikörper verursacht worden sein, die sich gegen die beiden entsprechenden Antigene richteten. Es gab damit verschiedene Möglichkeiten, die die positive Reaktion im GIFT erklären konnten: Zunächst konnte dieses Ergebnis ein Artefakt sein: Der nur sehr geringe Anteil an positiven Zellen (3,05%) sprach für diese Annahme. Ein weiteres Argument für diese These lieferte die Tatsache, daß lediglich die Zellen aus dem Produkt positiv reagiert hatten. Die Annahme, dies läge darin begründet, daß die Zellen im Präparat aktiviert worden waren, ließ sich damit entkräften, daß die Reaktion im GIFT nur sehr schwach ausfiel. Ein zusätzlicher Erklärungsansatz für das positive GIFT-Ergebnis war zweifelsohne das Vorliegen von HLA-Antikörpern. Dagegen spricht aber das negative Ergebnis im LCT. Als letzte Möglichkeit konnten auch andere Antikörper als die gegen NA1/NA2 gerichteten vorgelegen haben. Da mit den beiden getesteten Antikörper bereits die am häufigsten vorkommenden Antikörper erfasst worden waren, war die Wahrscheinlichkeit eher gering. Damit konnte davon ausgegangen werden, daß das positive Ergebnis auf ein Artefakt zurückzuführen war.

In der durchgeführten Testreihe spielte die Entwicklung granulozytärer Antikörper also keine Rolle. Während der Untersuchungen an drei verschiedenen Patienten traten keinerlei Transfusionsreaktionen auf, die auf das Vorliegen von Antikörpern gegen die transfundierten Granulozyten schließen ließen, und in den verschiedenen Assays konnten solche Antikörper nicht nachgewiesen werden. Die Auswertung des klinischen Outcome der Patienten (s.o.) ergab keinerlei Anhaltspunkte für antikörperinduzierte Transfusionsreaktionen und auch der Patient, der Zellen von mehreren Spendern erhalten hatte, entwickelte keine detektierbaren granulozytären Antikörper. Damit schien das Auftreten solcher Antikörper nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Da die Zahl der untersuchten Patienten mit drei relativ gering war, sollten diese Untersuchungen aber weiter fortgeführt und beobachtet werden.

V. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung verschiedener Funktionen von Granulozyten, die im Tübinger Apheresezentrum zur Transfusion bei neutropenischen Patienten gewonnen wurden. Die Granulozytenspender wurden vor der Apherese mit humanem, rekombinantem Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (rhG-CSF, Neupogen[®], Amgen, Thousand Oaks, CA, USA) konditioniert, um die Anzahl der Granulozyten im peripheren Blut zu erhöhen. Zu klären war in diesem Zusammenhang, ob und wenn ja in welchem Maß die Funktion der Zellen durch die G-CSF-Stimulation der Spender und/oder die Apherese beeinflusst werden. Im Fokus des Interesses stand außerdem die Entwicklung granulozytärer Antikörper.

Folgende Funktionen der Zellen wurden untersucht und folgende Parameter bestimmt:

- Chemotaxis (Wanderstrecke und Zahl der wandernden Zellen)
- Phagozytose (*E.coli* und Conidien von *Aspergillus fumigatus*)
- Oxidativer Burst (nach Stimulation mit *E.coli* und f-MLP)
- Expression von Oberflächenantigenen (sog. Aktivierungsmarker)
- Zytokinproduktion (IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α)
- Stimulus-Response-Coupling (LTB₄-Produktion)
- Entwicklung granulozytärer Antikörper im Patientenserum

Im Rahmen dieser Dissertation konnte dokumentiert werden, daß weder die G-CSF-Gabe an den Spender noch die Apherese die Funktionen der Zellen signifikant beeinflussen. Auch im Patienten waren die transfundierten Zellen getestet worden und zeigten keine Anzeichen signifikant eingeschränkter Funktion.

Während die Stimulation der Spender z.T. sogar eine Verbesserung der Granulozytenfunktion bewirkte (Phagozytose und oxidativer Burst), zeigten die Apheresezellen zwar in einigen Fällen eine schlechtere Leistung als die Zellen nach Stimulation. Diese Resultate waren aber nicht signifikant, und die Zellfunktion war stets mit der Funktion von Granulozyten unstimulierter Spender vergleichbar. Die Apherese nahm damit lediglich die durch G-CSF induzierten Veränderungen wieder zurück. Auch im Empfänger arbeiteten alle Zellen normal, Veränderungen im Produkt schienen also vorübergehend zu sein. Die in diese Studien eingeschlossenen, nach G-CSF-Gabe durch Apherese gewonnenen Präparate erwiesen sich damit als unbe-

schädigt und versprachen eine effektive und für den Patienten sichere Behandlung bakterieller Infektionen und Pilzinfektionen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde außerdem deutlich, daß mit der Transfusion der Granulozytenkonzentrate keine bedenklichen Mengen an Zytokinen übertragen wurden. Die verschiedenen proinflammatorischen Zytokine waren in kaum meßbaren (IL-1 β , IL-6, TNF- α) oder in nicht bedenklichen Mengen (IL-8) im Produkt enthalten und stellten damit keine Gefahr für den Empfänger dar.

Die Rolle granulozytärer Antigene und Sensibilisierung der Patienten gegen HLA-Merkmale der Spender wurde in der vorliegenden Arbeit als untergeordnet eingestuft. Keiner der untersuchten Patienten entwickelte während der Behandlung mit Granulozyten nachweisbare granulozytäre Antikörper oder HLA-Antikörper. Die angewandten Methoden decken ein breites Spektrum an Antikörpern ab, Fehler in der Methodik spielen dabei kaum eine Rolle. Dennoch bleiben für die Zukunft weitere Untersuchungen im Zusammenhang mit granulozytären Antikörpern und HLA-Antikörpern wichtig, da in dieser Arbeit nur relativ wenige Patienten untersucht werden konnten, und durch Antikörper verursachte Reaktionen zu den schwerwiegenden Transfusionszwischenfällen gezählt werden müssen.

Für die Zukunft ist die Transfusion von Granulozytenkonzentraten weiter von großem Interesse. Trotz ständiger Weiterentwicklung der Antibiotika- und Antimykotikatherapie stellen sie eine wichtige Therapiemöglichkeit dar. Sie sind in der Lage, die den neutropenischen Patienten fehlende „Abräumfunktion“ zu ersetzen, und sind damit wichtige „Mitreiter“ im Kampf gegen unterschiedlichste Infektionen. Auch vor dem Hintergrund zunehmender Antibiotika- und Antimykotikaresistenzen bieten sie eine ausgezeichnete zusätzliche Therapiemöglichkeit. Mit den vorliegenden Daten konnte bewiesen werden, daß die Granulozytentransfusion Sinn macht und eine sichere therapeutische Maßnahme darstellt, weil die Funktion der Zellen über Stimulation des Spenders mit Neupogen, die Gewinnung der Zellen per Zytapherese bis hin zur Transfusion des Patienten erhalten bleibt und im Laufe dieses Prozesses nicht oder nur geringfügig verändert wird.

Literaturverzeichnis

- Alavi,J.B., Root,R.K., Djerassi,I., Evans,A.E., Gluckman,S.J., MacGregor,R.R., Guerry,D., Schreiber,A.D., Shaw,J.M., Koch,P., & Cooper,R.A. (1977) A randomized clinical trial of granulocyte transfusions for infection in acute leukemia. *N.Engl.J.Med.*, **296**, 706-711.
- Allen,R.C., Stevens,P.R., Price,T.H., Chatta,G.S., & Dale,D.C. (1997) In Vivo Effects of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor on Neutrophil Oxidative Functions in Normal J.-M Human Volunteers. *The Journal of Infectious Diseases*, **175**, 1184-1192.
- Altstaedt,J., Kirchner,H., & Rink,L. (1996) Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8. *Immunology*, **89**, 563-568.
- Anderlini,P., Przepiorka,D., Seong,D., Miller,P., Sundberg,J., Lichtiger,B., Norfleet,F., Chan,K.W., Champlin,R., & Korbling,M. (1996) Clinical toxicity and laboratory effects of granulocyte-colony-stimulating factor (filgrastim) mobilization and blood stem cell apheresis from normal donors, and analysis of charges for the procedures [see comments] [published erratum appears in Transfusion 1997 Jan;37(1):109]. *Transfusion*, **36**, 590-595.
- Bensinger,W.I., Price,T.H., Dale,D.C., Appelbaum,F.R., Clift,R., Lilleby,K., Williams,B., Storb,R., Thomas,E.D., & Buckner,C.D. (1993) The effects of daily recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration on normal granulocyte donors undergoing leukapheresis [see comments]. *Blood*, **81**, 1883-1888.
- Boyden (1962) The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J.Exp.Med.*, **115**, 453.
- Brach,M.A. & Hermann,F. (1992) Interleukin-6: presence and future. *Int.Journ.Clin.Lab.Res.*, **22**, 151.
- Brecher (1953) Transfusions of separated leukocytes into irradiated dogs with aplastic marrows. *Proc.Soc.Exp.Biology (N.Y)*, **84**, 54.
- British Committee for Standards in Hematology (1998) British Committee for Standards in Hematology: Guidelines on the clinical use of leukocyte-depleted blood components. *Transfus.Med.*, **8**, 59-71.
- Buckner,C.D., Clift,R.A., Thomas,E.D., Hersman,J., Sanders,J.E., Stewart,P.S., Wade,J.C., Murphy,M., Counts,G., & Meyers,J.D. (1983) Early infectious complications in allogeneic marrow transplant recipients with acute leukemia: effects of prophylactic measures. *Infection*, **11**, 243-250.

- Bux,J., Kober,B., Kiefel,V., & Mueller-Eckardt,C. (1992) Analysis of granulocyte-reactive antibodies using an immunoassay based upon monoclonal-antibody-specific immobilization of granulocyte antigens. *Transfus.Med.*, **3**, 157-162.
- Bux,J., Hoch,J., Bindl,L., & Mueller-Eckardt,C. (1994) Die transfusionsassoziierte Lungeninsuffizienz: eine seltene aber lebensbedrohliche Transfusionsreaktion. *Transfusionsmedizin 1993/94.Beitr Infusionsther Transfusionsmed.Basel 1994*, **32**, 470-473.
- Bux,J., Becker,F., Seeger,W., Kilpatrick,D., Chapman,J., & Waters,A. (1996) Transfusion-related acute lung injury due to HLA-A2-specific antibodies in recipient and NB-1specific antibodies in donor blood. *Br.J.Haematol.*, **93**, 707-713.
- Bux,J., Stein,E.-L., Bierling,P., Fromont,P., Clay,M., Stroncek,D., & Santoso,S. (1997) Characterization of a New Alloantigen (SH) on the Human Neutrophil FCy receptor IIIb. *Blood*, **89**, 1027-1034.
- Cairo,M.S. (1990) The use of granulocyte transfusion in neonatal sepsis. *Transfus.Med.Rev.*, **4**, 14-22.
- Capsoni,F., Minonzio,F., Ongari,A.M., & Zanussi,C. (1989) A new simplified single-filter assay for 'in vitro' evaluation of chemotaxis of ⁵¹Cr-labeled polymorphonuclear leukocytes. *J.Immunol.Methods*, **120**, 125-131.
- Caspar,C.B., Seger,R.A., Burger,J., & Gmur,J. (1993) Effective stimulation of donors for granulocyte transfusions with recombinant methionyl granulocyte colony-stimulating factor [see comments]. *Blood*, **81**, 2866-2871.
- Christensen,R.D., Rothstein,G., Anstall,H.B., & Bybee,B. (1982) Granulocyte transfusions in neonates with bacterial infection, neutropenia, and depletion of mature marrow neutrophils. *Pediatrics*, **70**, 1-6.
- Clift,R.A., Sanders,J.E., Thomas,E.D., Williams,B., & Buckner,C.D. (1978) Granulocyte transfusions for the prevention of infection in patients receiving bone-marrow transplants. *N.Engl.J.Med.*, **298**, 1052-1057.
- Clift,R.A. & Buckner,C.D. (1984) Symposium on infectious complications of neoplastic disease (Part II). Granulocyte transfusions. *Am.J.Med.*, **76**, 631-636.
- Coffey,M.J., Phare,S.M., George,S., & et al. (1998) Granulocyte colony-stimulating factor administration to HIV-infected subjects augments reduced leukotriene synthesis and anticryptococcal activity in neutrophils. *J Clin Invest*, **102**, 663-670.
- Dale,D.C., Liles,W.C., Summer,W.R., & et al. (1995) Granulocyte colony-stimulating factor: role and relationships in infectious diseases. *J Infect Dis*, **172**, 1075.

- Dale,D.C., Liles,W.C., Llewellyn,C., Rodger,E., & Price,T.H. (1998) Neutrophil transfusions: kinetics and functions of neutrophils mobilized with granulocyte-colony-stimulating factor and dexamethasone [see comments]. *Transfusion*, **38**, 713-721.
- Dutcher,J.P. (1989) The potential benefit of granulocyte transfusion therapy. *Cancer Invest*, **7**, 457-462.
- Engel,A., Kern,W.V., Murdter,G., & et al. (1994) Kinetics and correlation with body temperature of circulating interleukin-6, interleukin-8, tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta in patients with fever and neutropenia. *Infection*, **22** , 160-164.
- Erger,R.A. & Casale,T.B. (1998) Interleukin-8 plays a significant role in IgE-mediated lung inflammation. *Eur.Respir.J.*, **11**, 299-305.
- Fortuny,I.E., Bloomfield,C.D., Hadlock,D.C., Goldman,A., Kennedy,B.J., & McCullough,J.J. (1975) Granulocyte transfusion: a controlled study in patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Transfusion*, **15**, 548-558.
- Frampton,J.E., Lee,C.R., & Faulds,D. (1994) Filgrastim: a review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Efficacy in Neutropenia. *Drugs*, **48**, 731-760.
- Gaviria,J.M., van Burik,J.H., Dale,D.C., & et al. (2001) Comparison of interferon-gamma, granulocyte colony-stimulating factor, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for priming leukocyte-mediated hyphal damage of opportunistic fungal pathogens. *J Infect Dis*, **179**, 1041.
- Gerber,C.E., Kuci,S., Zipfel,M., Niethammer,D., & Bruchelt,G. (1996) Phagocytotic activity and oxidative burst of granulocytes in persons with myeloperoxidase deficiency. *Eur.J.Clin.Biochem.* , **34**, 901-908.
- Graw-RG,J., Herzig,G., Perry,S., & Henderson,E.S. (1972) Normal granulocyte transfusion therapy: treatment of septicemia due to gram-negative bacteria. *N.Engl.J.Med.*, **287**, 367-371.
- Grigg,A., Lusk,J., & Szer,J. (1995) G-CSF stimulated donor granulocyte collections for neutropenic sepsis. *Leuk.Lymphoma*, **18**, 329-334.
- Grigg,A., Vecchi,L., Bardy,P., & Szer,J. (1996) G-CSF stimulated donor granulocyte collections for prophylaxis and therapy of neutropenic sepsis. *Aust.N.Z.J.Med.*, **26**, 813-818.
- Hahn, J.-M (1998) *Checkliste Innere Medizin*, 2. Auflage edn.

- Hampton,M.B., Kettle,A.J., & Winterbourn,C.C. (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, **92**, 3007-3017.
- Hayashido,Y., Lucas,A., Rougeot,C., Godyna,S., Argraves,W.S., & Rochefort,H. (1998) Estradiol and fibulin-1 inhibit motility of human ovarian- and breast-cancer cells induced by fibronectin. *Int.J.Cancer*, **75**, 654-658.
- Heddle,N.M., Klama,L., & Singer,J. (1994) The role of plasma from platelet concentrates in transfusion reactions. *N.Engl.J.Med.*, **331**, 625-628.
- Hensler,T., König,B., Prevost,G., & et al. (1994) Leukotriene B4 generation and DNA fragmentation induced by leukocidin from *Staphylococcus aureus*: protective role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and G-CSF for human neutrophils. *Infect Immun*, **62**, 2529-2535.
- Herzig,R.H., Herzig,G.P., Graw-RG,J., Bull,M.I., & Ray,K.K. (1977) Successful granulocyte transfusion therapy for gram-negative septicemia. A prospectively randomized controlled study. *N.Engl.J.Med.*, **296**, 701-705.
- Hester,J.P., Dignani,M.C., Anaissie,E.J., Kantarjian,H.M., O'Brien,S., & Freireich,E.J. (1995) Collection and transfusion of granulocyte concentrates from donors primed with granulocyte stimulating factor and response of myelosuppressed patients with established infection. *J.Clin.Apheresis.*, **10**, 188-193.
- Higby,D.J., Yates,J.W., Henderson,E.S., & Holland,J.F. (1975) Filtration leukapheresis for granulocyte transfusion therapy. Clinical and laboratory studies. *N.Engl.J.Med.*, **292**, 761-766.
- Higby,D.J., Freeman,A., Henderson,E.S., Sinks,L., & Cohen,E. (1976) Granulocyte transfusions in children using filter-collected cells. *Cancer*, **38**, 1407-1413.
- Higby,D.J. & Burnett,D. (1980) Granulocyte transfusions: current status. *Blood*, **55**, 2-8.
- Hollingshead,L. & Goa,K.L. (1991) Recombinant Granulocyte Colony-Stimulating Factor (rG-CSF). *Drugs*, **42**, 300-330.
- Höglund,M., Hakansson,L., & Venge,P. (1997) Effects of in vivo administration of G-CSF on neutrophil functions in healthy volunteers. *Eur.J.Haematol.*, **58**, 195-202.
- Huestis,D.W. (1982) Leukapheresis and granulocyte transfusion. *Haematologia Budap.*, **15**, 39-55.
- Huestis,D.W. & Glasser,L. (1994) The neutrophil in transfusion medicine. *Transfusion*, **34**, 630-646.

- Hübel,K., Dale,D.C., Engert,A., & et al. (2001) Current status of granulocyte (neutrophil) transfusion therapy for infectious diseases. *J Infect Dis*, **183**, 321-328.
- Janeway,C.A. & Travers,P. (1997) *Immunologie*, 2 edn.
- Katoh,M., Takada,M., Nakatani,N., Cho,C., & Umeda,M. (1995) Chemotaxis and phagocytosis of neutrophils mobilized by granulocyte colony-stimulating factor in healthy donors for granulocyte transfusions. *Am J Hematol*, **49**, 96-97.
- Klein,H.G., Price,T.H., Strauss,R.G., & et al. (1997) Granulocyte transfusion redux. In: Education Program Book of the 1997 ASH Meeting. *American Society of Hematology 1997*, 138-145.
- Lane,T.A. & Lamkin,G.E. (1988) Stimulus-response coupling in fresh and stored granulocytes. *Transfusion*, **28**, 243-247.
- Laufer,S., Neher,K., Bayer,B., Homann,J., Reutter,E., & Tries,S. (1995) In-vitro test system for the evaluation of dual cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitors. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, **4**, 166-169.
- Liles,W.C., Rodger,E.R., Dale,D.C., & et al. (1994) Differential regulation of human neutrophil surface expression of CD14, CD11b, CD18 and L-Selectin following the administration of G-CSF in vivo and invitro. *Clin.Res.1994*, **42**, 304:A.
- Liles,W.C., Huang,J.E., van Burik,J.H., & et al. (1997) Granulocyte colony-stimulating factor administered in vivo augments neutrophil activity against opportunistic fungal pathogens. *J Infect Dis*, **175**, 1012-1015.
- Menitove,J.E. & Abrams,R.A. (1987) Granulocyte transfusions in neutropenic patients. *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, **7**, 89-113.
- Michna,H. (1989) Induced locomotion of human and murine macrophages: a comparative analysis by means of the modified Boyden-chamber system and the agarose migration assay. *Cell Tissue Res.*, **255**, 423-429.
- Miyagawa,B. & Klingemann,H.G. (1997) Phagocytosis and burst activity of granulocytes and monocytes after stem cell transplantation. *J.Lab Clin.Med.*, **129**, 634-637.
- Morstyn,G., Dexter,T.M., Foote,M., & (Hrsg.) (1998) *Filgrastim (r-metHuG-CSF) in clinical practice*, second edn.
- Mrowietz,U. & Jurgens,G. (1995) A method for the determination of leukocyte migration for large sample numbers by automated densitometric quantification. *J.Biochem.Biophys.Methods*, **30**, 49-58.

- Murea,S., Fruehauf,S., Zeller,W.J., & Haas,R. (1996) Granulocytes harvested following G-CSF-enhanced leukocyte recovery retain their functional capacity during in vitro culture for 72 hours. *J.Hematother.*, **5**, 351-357.
- Navari,R.M., Buckner,C.D., Clift,R.A., Storb,R., Sanders,J.E., Stewart,P., Sullivan,K.M., Williams,B., Counts,G.W., Meyers,J.D., & et,a. (1984) Prophylaxis of infection in patients with aplastic anemia receiving allogeneic marrow transplants. *Am.J.Med.*, **76**, 564-572.
- Navari,R.M., Buckner,C.D., Clift,R.A., Storb,R., Sanders,J.E., Stewart,P., Sullivan,K.M., Williams,B., Counts,G.W., Meyers,J.D., & et,a. (1984) Prophylaxis of infection in patients with aplastic anemia receiving allogeneic marrow transplants. *Am.J.Med.*, **76**, 564-572.
- Nelson,R.D., Quie,P.G., & Simmons,R.L. (1975) Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J.Immunol.*, **115**, 1650-1656.
- Nelson,R.D. & Herron,M.J. (1988) Agarose method for human neutrophil chemotaxis. *Methods Enzymol.*, **162**, 50-59.
- Nessa,K., Jarstrand,C., Johansson,A., & Camner,P. (1997) In vitro interaction of alveolar macrophages and *Aspergillus fumigatus*. *Environ.Res.*, **74**, 54-60.
- Neumeister,B., Kleihauer,A., Rossmann,V., Fehrenbach,E., Faigle,M., Baumbach,S., & Northoff,H. (1998) Induction of cytokines and expression of surface receptors in Mono Mac 6 cells after infection with different *Legionella* species. *APMIS*, **106**, 319-333.
- Partsch,G., Schwarzer,C., Neumuller,J., Dunky,A., Petera,P., Broll,H., Ittner,G., & Jantsch,S. (1989) Modulation of the migration and chemotaxis of PMN cells by hyaluronic acid. *Z.Rheumatol.* , **48**, 123-128.
- Peters,B.G., Adkins,D.R., Harrison,B.R., & et al. (1996) Antifungal effects of yeast-derived rhu-G-MCSF in patients receiving high-dose chemotherapy given with or without autologous stem cell transplantation: a retrospective analysis. *Bone Marrow Transplant*, **19**, 93-102.
- Pitrak,D.L. (1997) Effects of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the bactericidal functions of neutrophils. *Curr.Opin.Hematol.* , **4**, 183-190.
- Pole,J.G., Davie,M., Kershaw,I., Barter,D.A., & Willoughby,M.L. (1976) Granulocyte transfusion in treatment of infected neutropenic children. *Arch.Dis.Child*, **51**, 521-527.

- Popovsky, M.A. (1983) Transfusion-related Acute Lung Injury Associated with Passive Transfer of leukocyte Antibodies. *Am Rev Respir Dis*, **128**, 185-189.
- Price, T.H. (2000) The current prospects for neutrophil transfusions for the treatment of granulocytopenic infected patients. *Transfus. Med. Rev.*, **14**, 2-11.
- Rex, J.H., Bhalla, S.C., Cohen, D.M., Hester, J.P., Vartivarian, S.E., & Anaissie, E.J. (1995) Protection of human polymorphonuclear leukocyte function from the deleterious effects of isolation, irradiation, and storage by interferon-gamma and granulocyte-colony-stimulating factor. *Transfusion*, **35**, 605-611.
- Rolando, N., Claperton, M., Wade, J., Panetsos, G., Mufti, G., & Williams, R. (2000) Granulocyte colony-stimulating factor improves function of neutrophils from patients with acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, **12**, 1135-1140.
- Schafer, H., Hubel, K., Bohlen, H., Mansmann, G., Hegener, K., Richarz, B., Oberhauser, F., Wassmer, G., Holscher, A.H., Pichlmeier, H., Diehl, V., & Engert, A. (2000) Perioperative treatment with filgrastim stimulates granulocyte function and reduces infectious complications after oesophagectomy. *Ann Hematol*, **79**, 143-151.
- Schiffer, C.A. (1983) Granulocyte Transfusion Therapy. *Cancer Treat. Rep.*, **67**, 113-119.
- Schiffer, C.A. (1990) Granulocyte transfusions: an overlooked therapeutic modality. *Transfus. Med. Rev.*, **4**, 2-7.
- Schröder, J.-M. (1997) Identification and structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease. *Methods Enzymol*, **288**, 266-297.
- Stahl, D. Pathophysiologie der Granulozytenfunktion. 12-3-1997. Ref Type: Hearing
- Stahl, D. & Hänsch, G.M. (1998) Granulozyten-Funktionsprüfung. In: *Labor und Diagnose* (ed. Thomas, L.), 804-807. Frankfurt/Main.
- Strauss, R.G., Connett, J.E., Gale, R.P., Bloomfield, C.D., Herzig, G.P., McCullough, J., Maguire, L.C., Winston, D.J., Ho, W., Stump, D.C., Miller, W.V., & Koepke, J.A. (1981) A controlled trial of prophylactic granulocyte transfusions during initial induction chemotherapy for acute myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.*, **305**, 597-603.
- Strauss, R.G. (1993) Therapeutic Granulocyte Transfusions in 1993. *Blood*, **81**, 1675-1678.

- Stroncek,D.F., Shapiro,R.S., Filipovich,A.H., Plachta,L.B., & Clay,M.E. (1993) Prolonged neutropenia resulting from antibodies to neutrophil-specific antigen NB1 following marrow transplantation. *Transfusion*, **33**, 158-163.
- Stroncek,D.F., Leonard,K., Eiber,G., Malech,H.L., Gallin,J.I., & Leitman,S.F. (1996) Alloimmunization after granulocyte transfusions. *Transfusion*, **36**, 1009-1015.
- Stroncek,D.F., Jaszcz,W., Herr,G.P., Clay,M.E., & McCullough,J. (1998) Expression of neutrophil antigens after 10 days of granulocyte-colony-stimulating factor. *Transfusion*, **38**, 663-668.
- Strumia (1934) The effect of leukocytic cream injections in the treatment of the neutropenias. *Am.Journ.Of.Med.Sci.*, **187**, 527.
- Tascini,C., Baldelli,F., Monari,C., Retini,C., Pietrella,D., Francisci,D., Bistoni,F., & Vecchiarelli,A. (1996) Inhibition of fungicidal activity of polymorphonuclear leukocytes from HIV-infected patients by interleukin (IL)-4 and IL-10. *AIDS*, **10**, 477-483.
- The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group (1997) Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group. *N.Engl.J.Med.*, **337**, 1861-1869.
- Vamvakas,E.C. & Pineda,A.A. (1996) Meta-Analysis of Clinical Studies of the Efficiency of Granulocyte Transfusions in the Treatment of Bacterial Sepsis. *J.Clin.Apheresis.*, **11**, 9.
- Vogler,W.R. & Winton,E.F. (1977) A controlled study of the efficacy of granulocyte transfusions in patients with neutropenia. *Am.J.Med.*, **63**, 548-555.
- Weiblen,B.J., Forstrom,L., & McCullough,J. (1979) Studies of the kinetics of indium-111-labeled granulocytes. *J.Lab Clin.Med.*, **94**, 246-255.
- Winston,D.J., Ho,W.G., & Gale,R.P. (1982) Therapeutic granulocyte transfusions for documented infections. A controlled trial in ninety-five infectious granulocytopenic episodes. *Ann.Intern.Med.*, **97**, 509-515.
- Wright,D.G. (1984) Leukocyte Transfusions: Thinking Twice. *Am.J.Med.*, **76**, 637-644.
- Young,L.S. (1983) The role of granulocyte transfusions in treating and preventing infection. *Cancer Treat.Rep.* , **67**, 109-111.

Zipfel,M., Carmine,T.C., Gerber,C., Niethammer,D., & Bruchelt,G. (1997) Evidence for the activation of myeloperoxidase by f-Meth-Leu-Phe prior to its release from neutrophil granulocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **232**, 209-212.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Frau PD Dr. Birgid Neumeister, Abt. Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen und Herrn Prof. Dr. Stefan Laufer, Institut für pharmazeutische Chemie der Universität Tübingen, im Labor der Transfusionsmedizin durchgeführt.

Frau PD Dr. Birgid Neumeister danke ich besonders für die Bereitstellung des Themas, für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und die stete Diskussionsbereitschaft. Weiterhin danke ich Frau PD Dr. Neumeister für die Möglichkeit, meine Forschungsergebnisse zu publizieren und ihre besonders wertvollen Ratschläge bei der Erstellung des entsprechenden Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. Stefan Laufer danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens, seine vielen wertvollen Ratschläge und für die Möglichkeit, Ergebnisse beim European Graduate Student Meeting vorzustellen.

Herzlicher Dank gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Transfusionsmedizin, Tübingen, Dr. Elvira Fehrenbach, Melanie Jesse, Dr. Christine Jork, Corinna Mostertz, Andrea Péterfi, und Dr. Christof Weinstock, die stets bereit waren, Hilfestellung zu leisten, wertvolle Anregungen beisteuerten und nicht zuletzt zu einem sehr angenehmen Arbeitsklima beitrugen. Dr. Fehrenbach und Dr. Weinstock danke ich besonders für die geduldige Einarbeitung am Durchflußzytometer.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. Rainer F. Hörnlein für die Betreuung und Initiierung des Projekts, die Hilfestellung beim Entwurf, der Planung und der Durchführung der einzelnen Versuche, wertvolle Anregungen und die exzellente Zusammenarbeit.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Transfusionsmedizin, besonders den Schwestern und Ärzten im Apheresezentrum. Durch Ihr zuverlässiges Sammeln meiner Proben haben sie einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet. Desgleichen gilt für das Pflegepersonal der verschiedenen in das Projekt eingebundenen Stationen der Medizinischen Klinik und der Kinderklinik, die die pünktliche Probenabnahme bei den Patienten übernommen haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jens-Michael Schröder, Hautklinik der Universität Kiel und Frau Dörte Hansen für die ausführliche Einarbeitung in das Boydenkammer-Assay und die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe.

Außerdem danke ich Herrn PD Dr. Jürgen Bux sowie den Mitarbeiterinnen des Leukozytenlabors der Abteilung Transfusionsmedizin der Universität Giessen für die herzliche Aufnahme, die detaillierte Einarbeitung in die verschiedenen Antikörper-Assays (GAT, GIFT und MAIGA), ihre stete Bereitschaft, Fragen zu beantworten und bei Problemen Hilfestellung zu leisten. Herrn PD Dr. Bux danke ich außerdem für die Bereitschaft, einen Teil meiner Ergebnisse zu diskutieren.

Prof. Dr. Hinnak Northoff, Transfusionsmedizin Tübingen, danke ich für die Bereitstellung der ausgezeichneten Forschungsbedingungen und die fruchtbaren Debatten.

Herrn Prof. Dr. Joachim E. Schultz danke ich für seine Bereitschaft, diese Arbeit und die Hauptfachprüfung mitzubetreuen.

Außerordentlicher Dank gilt meinen Freundinnen Andrea Mross, Andrea Péterfi, Claudia Péterfi, Corinna Mostertz und Melanie Jesse für ihre besonders verständnisvolle Unterstützung, ihre unentbehrliche Aufmunterung und dafür, daß sie immer und zu jeder Zeit für mich da waren.

Bedanken möchte ich mich bei meiner Familie, die mir durch ihre Unterstützung das Studium und die Promotion ermöglicht haben und immer an mich geglaubt haben.

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt meinem Freund Jörn Schulte, für sein Verständnis, seine unermüdliche Unterstützung und Aufmunterung und seinen unerschütterlichen Glauben an meine Arbeit. Seine liebevolle Unterstützung abseits des Labors hat mich immer wieder motiviert und mir sehr viel Kraft und Ausdauer gegeben.

Schließlich gilt mein Dank allen nicht näher erwähnten Personen und Freunden, die jeder auf seine oder ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sei es durch Hilfestellung im Labor oder durch die persönliche Bereicherung, die ich durch sie erfahren habe.

Die vorliegende Arbeit wurde teilweise aus Mitteln der Firma Amgen, Thousand Oaks, CA, USA, gefördert.

Publikationsverzeichnis

Joos, K., Herzog, R., Laufer, S., Northoff, H., Neumeister, B.: Characterization and functional analysis of granulocyte concentrates from donors primed with G-CSF
Poster auf dem Third European Graduate Student Meeting, Frankfurt 23.-25.2.2001, *Arch. Pharm. Med. Chem.* (Suppl. 1), S.21.

Joos, K., Herzog, R., Einsele, H., Handgretinger, R., Northoff, H., Neumeister, B.: Transfusion of granulocyte concentrates received from donors primed with G-CSF in neutropenic patients with life-threatening infections
Poster EuCid 2001, Leipzig 3.-6.5.01, *Infection* 29, 2001, Supplement 1, S.73

Joos, K., Herzog, R., Einsele, H., Handgretinger, R., Northoff, H., Neumeister, B.: Transfusion of granulocyte concentrates received from donors primed with G-CSF in neutropenic patients with life-threatening infections
Poster und Vortrag auf dem 43. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft Für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e.V., Hamburg 25.-28.9.2001, *Infus Ther Transfus Med* 2001; 28: (Sonderheft1): 18.

Joos, K., Herzog, H., Einsele, H., Northoff, H., Neumeister, B.:
Characterization and Functional Analysis of Granulocyte Concentrates Collected from Donors after Repeated G-CSF Stimulation
(eingereichtes Manuskript, *Transfusion*)

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer waren:

G. Bruchelt, J. Bux, R. Csuk, H.-P. Deigner, R. Dillmann-Marschner, E. Fehrenbach, Hr. Fricke, C. Gerber, R. Gleiter, R. Handgretinger, R. Herzog, Hr. Hilgenfeldt, R.F. Hörnlein, S. Laufer, Hr. Ludwig, R. Neidlein, B. Neumeister, H. Northoff, R. Reichling, J.-M. Schröder, J.E. Schultz, Hr. Stricker, C. Weinstock, M. Wink

Lebenslauf

Katja Joos

Persönliche Daten:

Geburtstag und -ort: 07.06.1973, Heidelberg
Eltern: Gisela Joos (geb. Bess) und Klaus Joos

Schulbildung:

1979-1983 Tiefburg-Grundschule, Heidelberg
1983-1992 Bunsen-Gymnasium, Heidelberg. Abitur

Studium

1992-1997 Studium der Pharmazie an der Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg
1995 erstes Staatsexamen
1997 zweites Staatsexamen

Praktische Ausbildung:

Mai 1997-Oktober 1997 Bergheimer-Apotheke, Heidelberg
November 1997-April 1998 Boehringer Mannheim, Mannheim
Juni 1998 Approbation als Apothekerin

Promotion:

1998-2002 Dissertation an der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen und an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen zum Thema: „Charakterisierung und Funktionstestung von Granulozytenpräparaten in vitro und ex vivo im Rahmen einer klinischen Studie“ unter Anleitung von Frau PD Dr. B. Neumeister (Transfusionsmedizin) und Prof. Dr. S. Laufer (Fakultät für Chemie und Pharmazie)

Anstellung als Apothekerin:

1999-2001

Vertretungen in der Steinbock-Apotheke, Stuttgart

Mai 2001-Oktober 2001

Hirsch-Apotheke, Reutlingen

seit November 2001

Azupharma, Gerlingen, Qualitätskontrolle