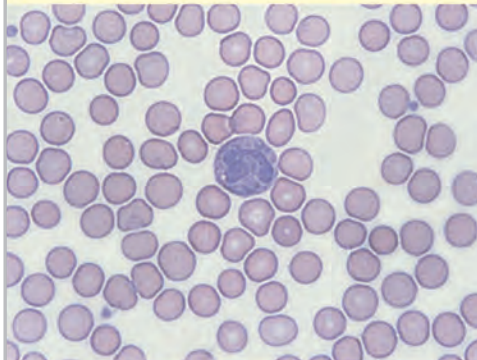


VORBEHANDLUNG VON BLUTSPENDERN MIT G-CSF FÜR DIE PRÄPARATIVE GRANULOZYTAPHERESE

MIRKO MAJOREK

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Vorbehandlung von Blutspendern mit G-CSF
für die präparative Granulozytapherese**

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Bernd Mirko Majorek

aus Wittlich

Gießen 2009

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin

Direktor: Prof. Dr. med G. Bein

des

Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH,

Standort Gießen

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med U. Sachs

2. Gutachter: Frau Prof. Dr. med B. Kemkes-Matthes

Disputation: 21.07.2010

0.1. Inhaltsverzeichnis

0.1. Inhaltsverzeichnis.....	3
0.2. Abkürzungsverzeichnis	5
0.3. Abbildungsverzeichnis	5
0.4. Tabellenverzeichnis	6
0.5. Erklärung.....	6
1. Einleitung.....	7
1.1. Granulozyten.....	7
1.1.1. Einteilung, Definition.....	7
1.1.2. Funktion.....	7
1.1.3. Bildung und Lebenszyklus.....	7
1.1.4. G-CSF	8
1.1.5. Bedeutung	8
1.2. Granulozytopenie	9
1.2.1. Vorkommen	9
1.2.2. Symptomatik.....	10
1.2.3. Therapie	10
1.2.3.1. G-CSF.....	11
1.2.3.2. Granulozytentransfusion	11
1.3. Das Granulozytenkonzentrat.....	12
1.3.1. Geschichtlicher Überblick	12
1.3.2. Stimulation.....	14
1.3.3. Kriterien	15
1.3.3.1. Spenderauswahl	15
1.3.3.2. Spendersicherheit	16
1.3.3.3. Präparation	16
1.3.3.4. Lagerung.....	16
1.3.3.5. Qualitätskontrolle	17
1.4. Ziel der Studie.....	17
1.4.1. Arzneimittelsicherheit	17
1.4.1.1. Bisherige Studienlage	17
1.4.2. Spendersicherheit.....	18
1.4.3. Zuverlässigkeit im Spendeverfahren	18
2. Material und Methoden	20
2.1. Studiendesign und Ablauf der Studie	20
2.1.1. Grundsätzliche Überlegungen und Planung	20
2.1.2. Globale Fragestellungen	20
2.1.2.1. Studienziel Zuverlässigkeit des Verfahrens	20
2.1.2.2. Studienziel Arzneimittelsicherheit	21
2.1.2.3. Studienziel Spendersicherheit.....	21
2.1.3. Studienpopulation.....	22
2.1.3.1. Einschlusskriterien	22
2.1.3.2. Ausschlusskriterien	22
2.1.4. Geplanter Stichprobenumfang.....	22
2.1.5. Rekrutierung von Spendezentren und Prüfpärzten.....	22
2.1.6. Rekrutierung von Spendern.....	23
2.1.7. Dauer der Studie	23
2.1.8. Studienablauf.....	24

2.1.8.1. Voruntersuchung.....	24
2.1.8.2. Stimulation	24
2.1.8.3. Dokumentation des Spendevorgangs	25
2.1.8.4. Nachuntersuchungen	26
2.1.9. Durchführung der Studie	26
2.2. Analyse der Daten.....	27
2.2.1. Deskriptive Statistik	27
2.2.2. Inferenzstatistik	28
2.2.2.1. Klassifizierung der Einflussvariablen	28
2.2.2.2. Eingesetzte Verfahren	29
2.2.2.3. Bildung von Subgruppen.....	30
3. Ergebnisse.....	31
3.1. Zusammensetzung des Spenderkollektivs	31
3.1.1. Spenderkollektiv	31
3.1.2. Subgruppe für die inferenzstatistische Untersuchung möglicher Einflussfaktoren.....	32
3.2. Deskriptive Statistik	35
3.2.1. Zielvariable Stimulationserfolg.....	35
3.2.2. Zielvariable Separationserfolg	36
3.2.3. Zielvariable Nebenwirkung	37
3.3. Einfaktorielle Suche nach Einflussvariablen	38
3.3.1. Alter	38
3.3.2. Geschlecht	39
3.3.3. Spendezentrum	39
3.3.4. G-CSF-Typ	40
3.4. Multifaktorielle Suche nach Einflussvariablen	40
3.4.1. Stimulationserfolg	40
3.4.2. Separationserfolg	41
3.5. Zusammenhang von Stimations- und Separationserfolg.....	42
3.6. Einfluss wiederholter Spende auf Stimations- und Separationserfolg	43
3.6.1. Erster Ansatz: ein Zentrum, keine Einflussvariablen	43
3.6.2. Zweiter Ansatz: mehrere Zentren, mit Wechselwirkung	44
3.7. Nebenwirkungen	47
3.7.1. Einflüsse auf das Auftreten von Nebenwirkungen	47
3.7.2. Nebenwirkungen und wiederholtes Spenden	48
3.8. Sicherheit und Komplikationen.....	49
3.9. Nachuntersuchungen	50
4. Diskussion	52
4.1. Spenderkollektive	52
4.2. Stimulationserfolg.....	53
4.3. Separationserfolg	54
4.4. Nebenwirkungen	56
4.5. Sicherheit und Zuverlässigkeit	57
4.6. Abschließende Betrachtungen	59
5. Zusammenfassung	61
6. Summary	62
7. Lebenslauf – Curriculum Vitae.....	63
8. Anhang	64
8.1. Prüfplan.....	64
8.1.1. Voruntersuchung	64
8.1.2. Spendedokumentation.....	64

8.1.3. Nebenwirkungen.....	66
8.1.4. Nachuntersuchung	67
8.2. Datentabellen.....	68
8.2.1. Zielvariable Stimulationserfolg.....	68
8.2.2. Zielvariable Separationserfolg	73
8.2.3. Pathologische Befunde der Nachuntersuchungen.....	78
8.2.4. Mehrfachspende: Ergebnisse der Friedman-Anschlussstests.....	81
9. Danksagungen	82
10. Literaturnachweis	83

0.2. Abkürzungsverzeichnis

µg/kg KG	Mikrogramm pro Kilogramm Körpergewicht
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
CHO	Chinese Hamster Ovary
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
EMA	European Medicines Agency
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GM-CFU	Granulocyte-Macrophage Colony Forming Unit
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
HAES	Hydroxy-Äthyl-Starke
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
n	Anzahl
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit
PBSC	Periphery Blood Stem Cell
WBC	White Blood Cell

0.3. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 - Flussdiagramm Datenauswahl zur Untersuchung von Einflussfaktoren.....	33
Abb. 2 - Stimulationserfolg nach Spendezahl	35
Abb. 3 - Separationserfolg nach Spendezahl	36
Abb. 4 - Nebenwirkungen aller Stimulationen.....	37
Abb. 5 - Nebenwirkungen der 1. Spende nach Zentrum und Geschlecht.....	38
Abb. 6 - Stimulationsergebnis: Wechselwirkung Zentrum x Geschlecht.....	41

Abb. 7 - Separationsergebnis: Wechselwirkung Zentrum x G-CSF-Typ.....	42
Abb. 8 - Flussdiagramm Datenauswahl zur Untersuchung der Mehrfachspende.....	45
Abb. 9 - Mehrfachspende und Stimulationserfolg.....	46
Abb. 10 - Mehrfachspende und Separationserfolg.....	47

0.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Klassifizierung des Alters.....	28
Tabelle 2 - Klassifizierung der G-CSF-Dosis.....	28
Tabelle 3 - Klassifizierung des Stimulationserfolgs.....	29
Tabelle 4 - Spenderübersicht.....	32
Tabelle 5 - Eingeschränktes Spenderkollektiv.....	34
Tabelle 6 - Spenderblutbild vor erster Apherese.....	36
Tabelle 7 - Blutbild der hergestellten Präparate aus ersten Spenden.....	37
Tabelle 8 - Zusammenhang Stimulation- und Separationserfolg.....	43
Tabelle 9 - Wiederholtes Spenden - 1. Ansatz.....	44
Tabelle 10 - Wiederholtes Spenden und Nebenwirkungen.....	49
Tabelle 11 - Komplikationen und Spendeabbrüche.....	49
Tabelle 12 - pathologische Befunde der Nachuntersuchungen.....	50
Tabelle 13 - Auftreten der Nebenwirkung Juckreiz.....	51

0.5. Erklärung

“Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Mirko Majorek

1. Einleitung

1.1. Granulozyten

1.1.1. Einteilung, Definition

Unter den zellulären Bestandteilen des Blutes werden rote und weiße Zellen sowie Plättchen unterschieden, die weißen Blutzellen wiederum in Granulozyten und mononukleäre Zellen. Charakteristisch für Granulozyten ist ihr unregelmäßiger Kern und zytoplasmatische Granula, aufgrund deren Färbereigenschaften in der Lichtmikroskopie neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten unterschieden werden. Die neutrophilen Granulozyten können wiederum nach der Form des Kern in jugendliche stabkernige und reife segmentkernige Neutrophilen unterschieden werden. ¹

1.1.2. Funktion

Allen Granulozyten gemein ist die Fähigkeit zur Chemotaxis und zur Phagozytose von Fremdkörpern. Die in den Granula gespeicherten Substanzen insbesondere von Neutrophilen und Eosinophilen sind Stoffe der unspezifischen Immunabwehr und Bakterizide. Während Eosinophile an der Abwehr von Pilzkrankungen und am Allergiegesehehen beteiligt sind, stellen Neutrophile die bakterielle Abwehr und räumen nekrotisches Gewebe sowie apoptotische Zellen ab. Durch Bildung von Sauerstoffradikalen und Hypochlorit können Bakterienwände zerstört werden, dies geschieht zum eigenen Schutz in den Phagozytosevesikeln. Neutrophile Granulozyten haben die Fähigkeit sowohl aeroben als auch anaeroben Stoffwechsel zu betreiben, eine essenzielle Fähigkeit, um im entzündeten oder nekrotischen Gewebe zu fungieren. ²

1.1.3. Bildung und Lebenszyklus

Granulozyten entstammen den myelopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Verschiedene Zytokine sind an der Proliferation und Differenzierung von Stammzellen über sogenannte *Granulocyte – Monocyte Colony forming units* (GM-CFU) und spezifische Vorstufen zum reifen Neutrophilen beteiligt. Die Interleukine 3 und 6 sind zu nennen, besondere Bedeutung kommt jedoch den *Colony stimulating factors* zu. So stimuliert GM-CSF, der *Granulocyte – Monocyte colony stimulating*

factor, die Bildung von GM-CFUs und Vorläuferzellen von anderen Leukozyten der myeloischen Reihe, G-CSF, der *Granulocyte colony stimulating factor*, ist für die Ausdifferenzierung und Reifungsprozesse der Neutrophilen spezifisch.

Die Lebensdauer von Neutrophilen ist, verglichen mit anderen Immunzellen, kurz. Die Reifungszeit im Knochenmark beträgt ca. elf Tage. Danach verbleibt der größte Anteil der Neutrophilen für etwa vier Tage in einem Reservepool im Knochenmark. Nach der Ausschwemmung ins Blut, wo seine Halbwertszeit bei ca. sechs Stunden liegt, migriert der neutrophile Granulozyt ins Bindegewebe, wo seine Verweildauer einen bis vier Tage beträgt, unabhängig davon, ob er Phagozytose betrieben hat oder nicht.³

1.1.4. G-CSF

G-CSF ist ein Peptidhormon bestehend aus 174 Aminosäuren, dessen Tertiärstruktur durch zwei Disulfidbrücken gesichert wird. *In vivo* ist G-CSF an einem Threoninrest glykosyliert, um es vor Konformitätsänderungen und Abbau zu schützen.

G-CSF wirkt an allen Zellen der neutrophilen Reihe durch Bindung an einen spezifischen Rezeptor, den G-CSF-Rezeptor (G-CSFR), der zur Superfamilie der Zytokinrezeptoren gehört.

G-CSF bewirkt im Knochenmark eine beschleunigte und erhöhte Bildung und Reifung von Granulozyten. Zusätzlich werden reife Granulozyten aus dem Knochenmarkdepot in die Zirkulation mobilisiert.⁴ Für G-CSF konnte nachgewiesen werden, dass es auch die Funktion reifer Granulozyten beeinflusst, so erhöht es die Migrationsgeschwindigkeit und die mikrobizide Aktivität der Granulozyten.⁵

Zur Zeit sind drei G-CSF-Präparate auf dem Markt: Filgrastim, Lenograstim und Pegfilgrastim. Filgrastim wird in *Escherichia coli* exprimiert und unterscheidet sich durch die fehlende Glykosylierung leicht von der *in vivo*-Struktur. Lenograstim, das in CHO-Zellen (chinese hamster ovary) hergestellt wird, ist strukturell nicht von natürlich vorkommendem G-CSF zu unterscheiden. Pegfilgrastim ist eine Weiterentwicklung von Filgrastim, PEGyliert und besitzt eine längere Halbwertszeit als andere G-CSF-Formen.

1.1.5. Bedeutung

Für die Immunkompetenz sind Granulozyten unabdingbar. Ihre große Anzahl und ihre Fähigkeit, im Gewebe Orte der Immunreaktion aktiv aufzusuchen und dort Fremdkörper aufzunehmen und abzubauen macht sie zu einer Grundlage der

Abwehr. Durch ihr massenhaftes Aufgebot versucht der Organismus, Infektionen möglichst rasch einzudämmen. Abgestorbene Neutrophile stellen den zellulären Bestandteil von Pus dar.

In der klinischen Praxis wird unter anderem die Granulozytenmenge relativ zu allen weißen Blutzellen als Grundlage für die Einschätzung von Infektgeschehen und Immunkompetenz angesehen. So ist bei vielen bakteriellen Infekten die Gesamtzahl der Leukozyten durch eine starke Vermehrung der Neutrophilen erhöht. Von einer „Linksverschiebung“ spricht man, wenn vermehrt jüngere und unreifere Granulozyten im peripheren Blut erscheinen und wertet dies als Zeichen eines eskalierenden akuten infektiösen Geschehens.

1.2. Granulozytopenie

Bei einem Abfall der zirkulierenden Granulozyten unter den unteren Normwert spricht man von einer Granulozytopenie. Häufig synonym verwendet wird der Begriff der Neutropenie, da die Neutrophilen den weitaus größten Teil der Granulozyten stellen. Dies ist bei Werten von unter 1500 Granulozyten/ μl erfüllt und wird als leichte Granulozytopenie bezeichnet, bei einem weiteren Abfall von unter 1000/ μl spricht man auch von einer moderaten Granulozytopenie.

Von einer absoluten Granulozytopenie oder auch Agranulozytose spricht man bei einer Verminderung der Neutrophilen im peripheren Blut auf $< 500/\mu\text{l}$ oder $< 1000/\mu\text{l}$ mit einem erwarteten Abfall von unter 500/ μl in den nächsten zwei Tagen.⁶

1.2.1. Vorkommen

Eine Neutropenie kann ihre Ursache grundsätzlich in einer verminderten Bildung, einem erhöhten Verbrauch bzw. Abbau von Granulozyten haben oder einer Kombination von beidem.

Im Erwachsenenalter treten hauptsächlich medikamententoxische Agranulozytosen auf. Zu den häufigen auslösenden Pharmaka gehören neben Metamizol auch andere nichtsteroidale Antiphlogistika, Thyreostatika wie Carbimazol oder Thiamazol, das Antibiotikum Cotrimoxazol, aber auch Psychopharmaka, z.B. Clozapin oder Clomipramin.

Im Kindesalter treten kongenitale Neutropenien auf, die teils mit anderen Immun- oder Gendefekten assoziiert sind, teils aber auch als idiopathische Formen eigene Krankheitsbilder darstellen.

Bei Malignomen kann es zu einer Verdrängung der hämatopoetischen Zellen oder bei nicht soliden Tumoren zu einem diffusen Überwachsen des funktionellen Knochenmarks mit Tumorzellen kommen. Auch unter zytostatischer Therapie, beispielsweise zur Vorbereitung einer Knochenmarktransplantation, kommt es ebenfalls nicht selten zu dieser schweren Komplikation, die dadurch besonders schwerwiegend wird, dass sie über Tage bis Wochen anhalten kann, beispielsweise, wenn ein Engraftment des Transplantats zunächst ausbleibt.⁷

Eine seltenere Ursache von Neutropenien bilden die Immunneutopenien, bei denen die Granulozyten durch Antikörper erkannt und vermehrt abgebaut werden. Ein vermehrter Abbau von Granulozyten kann beim Hypersplenismus beobachtet werden.

Bei schweren Infektionen oder Sepsis kann der Granulozytenverbrauch die Knochenmarksreserven entleeren, über die Kapazitäten des Knochenmarks zur Neubildung hinausgehen und zu einer Neutopenie bis hin zur Agranulozytose führen.

1.2.2. Symptomatik

Die Neutropenie führt zu erhöhter Infektanfälligkeit. So kann die Immunabwehr selbst mit der physiologischen Bakterienflora oder saprophytischen Pilzen überfordert sein. Typisch für eine Agranulozytose ist die Symptomentrias aus plötzlichem Fieberanstieg, Angina tonsillaris und Stomatitis aphthosa. Es kann zur Sepsis kommen, häufige Eintrittspforten oder Herde sind besagte Schleimhautläsionen, aber auch die Lunge, der Darm, die Haut und nicht zuletzt Katheter aller Arten. In einem Teil der Fälle findet sich kein Infektionsherd, auch ein Erregernachweis gelingt nicht immer. In diesen Fällen spricht man von Fieber unbekannter Ursache (FUO) bei Neutropenie.

1.2.3. Therapie

Je nach Ursache der Agranulozytose ist beispielsweise ein auslösendes Medikament abzusetzen oder eine zugrunde liegende Autoimmunerkrankung zu behandeln. Eine Umkehrisolation mit keimarmer Umgebung ist angezeigt. Bei Fieber ist eine sofortige kalkulierte Antibiose Therapie der ersten Wahl. Wird in der Blutkultur ein Keim nachgewiesen, muss dessen Resistenzlage nach Erhalt des Befundes berücksichtigt

werden. Bei Persistenz des Fiebers über drei Tage wird zusätzlich ein Antimykotikum gegeben.⁸

Eine Unterbrechung des Therapiezyklus bei Patienten zur Stammzelltransplantation kann jedoch das erfolgreiche Engraftment der transplantierten Zellen gefährden. So muss die Therapiestrategie auf ein Verhindern und Bekämpfen von Infektionen ausgerichtet sein. Eine Therapieoption bei anhaltender Neutropenie ist die Gabe von synthetisch hergestelltem G-CSF zur Beschleunigung der Granulopoese. Bei ausbleibendem Anstieg der Granulozytenzahl kann auch eine Transfusion von Granulozyten erwogen werden.

1.2.3.1. G-CSF

G-CSF stimuliert die Bildung neuer Granulozyten und verkürzt die zur Reifung benötigte Zeit. So kann die Zeit der Agranulozytose nach Absetzen einer Noxe wirksam verkürzt werden. Allerdings benötigen die Vorläuferzellen zur effektiven Granulopoese nicht nur die stimulierenden Zytokine, sondern auch ein intaktes Umgebungsgewebe, da sie mit ortsständigen Makrophagen und Fibroblasten interagieren. Dies kann den effektiven Einsatz von G-CSF zur Behandlung von Neutropenien einschränken. Indiziert ist G-CSF zur Prophylaxe und Therapie von neutropenen Zuständen bei der myelodepressiven Chemotherapie von malignen Erkrankungen, ausgenommen solcher der myeloischen Zellreihe. Außerdem kann es zu einer Langzeittherapie bei chronischen Neutropenien eingesetzt werden, so bei schwerer kongenitaler Neutropenie, zyklischer Neutropenie und idiopathischer Neutropenie. Auch bei persistierenden neutropenen Zuständen bei HIV-infizierten Patienten kann G-CSF eingesetzt werden.^{9,10}

1.2.3.2. Granulozytentransfusion

Ist das Knochenmark über längere Zeit nicht in der Lage, selbst ausreichend Granulozyten zu produzieren, beispielsweise wegen einer fortgesetzten Zytostatikatherapie, verzögertem Engraftment oder einer schweren Infektion, kann eine Granulozytentransfusion erwogen werden. Die erwartete Dauer einer Neutropenie sollte dabei über 5-7 Tagen liegen. Die Wirksamkeit von Granulozytentransfusionen wird zwar vereinzelt noch angezweifelt, aber die Durchsicht der aktuellen Studienlage ergibt einen starken Anhalt für die therapeutische und auch prophylaktische Gabe von Granulozytenkonzentraten.¹¹ Einerseits scheint der Zeitpunkt der Granulozytensubstitution ausschlaggebend für

einen Behandlungserfolg¹², zum anderen scheint die Dosis der transfundierten Granulozyten durchaus den Behandlungserfolg zu beeinflussen.¹³ Angestrebt wird eine Zahl von über 2×10^{10} Granulozyten täglich,¹⁴ andere schlagen deutlich höhere Zellmengen vor¹⁵. Derartige Präparationen müssen aufgrund der kurzen Lebensdauer der Granulozyten und der fehlenden Lagerungsfähigkeit¹⁶ von Granulozytenkonzentraten täglich hergestellt werden. Diese Anforderungen stellten in der Vergangenheit teils unüberwindbare Hindernisse dar.

1.3. Das Granulozytenkonzentrat

1.3.1. Geschichtlicher Überblick

Granulozyten bilden bei der Zentrifugation von Vollblut zusammen mit anderen Leukozyten und Thrombozyten eine dünne Schicht über dem Erythrozytensediment, die als *buffy coat* bezeichnet wird. Ein Abtrennen dieser Schicht stellt die ursprünglichste Form der Granulozytenisolation dar und wurde bereits 1934 als intramuskuläre Injektion von „Leukozyten-Paste“ erprobt¹⁷ – wenn auch ohne Erfolg. Dennoch wird der nahe liegende Gedanke einer Übertragung von Immunzellen hier bereits umgesetzt, auch wenn technische und prozedurale Unzulänglichkeiten deutlich werden.

Der Ansatz, bei Immuninkompetenz Granulozyten zu transfundieren, wurde tierexperimentell untersucht.¹⁸ Hunde mit aplastischem Knochenmark und resultierender Agranulozytose wurden mit einer potenziell letalen Infektion ausgesetzt. Nach Transfusion von Leukozyten konnte ein dosisabhängiger Anstieg der Überlebenswahrscheinlichkeit gezeigt werden. Diese Experimente wurden verschiedentlich variiert, um die Funktionalität¹⁹ und den Überlebensvorteil bei unterschiedlichen Infektionen zu demonstrieren.²⁰

Hauptsächliches Hindernis der Granulozytentransfusion blieb jedoch die Sammlung von ausreichend vielen Granulozyten. Bei der Isolation von *buffy coats* werden neben Granulozyten auch Thrombozyten und andere Leukozyten gewonnen; außerdem benötigt man sehr große Mengen Vollblut, um eine wirksame Granulozytendosis zu gewinnen. Die zu Beginn der 1970er Jahre klinisch eingesetzte Filtrationsleukapherese nutzt zur Selektion von Granulozyten deren Eigenschaft, sich an Nylonfasern anzulagern. In den eingesetzten Verfahren wird dem Spender durch eine venöse Punktion Blut kontinuierlich entnommen, Heparin

zur Antikoagulation zugesetzt und über eine oder zwei parallelgeschaltete Nylonwollsäulen geleitet, bevor es dem Spender über einen zweiten venösen Zugang wieder zugeführt wird.²¹ In einem zweiten Arbeitsschritt werden die Granulozyten von den Nylonfasern eluiert und zur Transfusion gesammelt. Vorteile dieser Methode ist die große Granulozytenzahl, die verhältnismäßig leicht erreicht werden kann. Außerdem kann das extrakorporale Blutvolumen gering gehalten werden, um so Kreislaufstörungen beim Spender möglichst zu vermeiden. Zu den Nachteilen muss ein hoher Heparineinsatz, normalerweise eine Gabe von 20000 Einheiten, gerechnet werden, der auch bei Antagonisierung mit Protamin nicht als völlig unproblematisch einzuordnen ist. Zudem kam es während der Filtrationsapherese zu Fällen von Priapismus, die auf die erhöhte Granulozytenadhäsion und Komplementaktivierung zurückgeführt werden.²² Für den geringen Transfusionserfolg entscheidend sind jedoch Veränderungen an den Granulozyten, die auf die Adhäsion und Elution zurückzuführen sind. Dabei wird ein Teil der Granulozyten aktiviert und verliert die funktionell bedeutsamen Granula. Sowohl in *in vitro*-Funktionstests als auch beim Transfusionserfolg zeigte sich²³ das Verfahren der differentiellen Zentrifugation dem der Filtrationsleukapherese überlegen.

Grundlage dieses Verfahrens ist die unterschiedliche Dichte und Sedimentationsgeschwindigkeit der verschiedenen Blutzellen. Entwickelt in den 1950er Jahren, ist sie mehrfach verbessert worden. So wurden zunächst Geräte eingesetzt, die ein festes Blutvolumen entnahmen, Antikoagulanzen zusetzten und nach Zentrifugation und Entnahme der gewünschten Fraktion den Rest des Blutes dem Spender wieder zuführten. Dieser Zyklus konnte wiederholt werden, um das prozessierte Blutvolumen bei Bedarf zu erhöhen.

Gegenüber den zyklisch arbeitenden Geräten wurden Maschinen mit einem kontinuierlichen Blutfluss entwickelt, wobei über eine Venenpunktion Blut entnommen, der Separatoreinheit zugeführt und die nach Abtrennung der Granulozyten verbleibende Fraktion über eine zweite Venenpunktion dem Spender wieder zurückgegeben wird. Mit dieser Technik wird ein höheres Prozessvolumen in kürzerer Zeit erreicht.²⁴

Eine Schwierigkeit der Zentrifugationsapherese ist, dass die Dichte der Granulozyten sich nur gering von der Dichte der Erythrozyten unterscheidet. Um trotz des geringen Dichteunterschieds eine möglichst genaue Auftrennung der Zellen zu ermöglichen,

werden Sedimentationsbeschleuniger eingesetzt. Unter der Vielzahl der hochmolekularen Substanzen hat sich HAES, Hydroxy-Äthyl-Stärke mit einem Molekulargewicht von 450000 Da, allgemein durchgesetzt. Sie bietet eine deutlich höhere Granulozytenausbeute als neuere und leichtere Kolloide, beispielsweise HAES mit einem Molekulargewicht von 130000 Da, das jedoch schneller aus der Zirkulation und dem Organismus eliminiert wird als die wochenlang nachweisbare Präparation mit 450000 Da.²⁵

Mit diesen Techniken konnten zwar funktionell intakte Zellen gewonnen werden, doch die gesammelten Zellmengen waren für die Therapie noch nicht ausreichend. Zur Granulozytenspende wurden teilweise Patienten mit unbehandelter chronisch-myeloischer Leukämie (CML) herangezogen, da sie eine sehr hohe Anzahl von zirkulierenden Neutrophilen aufweisen. Bei dieser Erkrankung treten bis zu 30fach mehr Neutrophile als normal auf, und so war auch bei geringen Prozessvolumina eine annehmbare Zellausbeute zu erzielen.^{26,27} Bedenken wegen der malignen Grunderkrankung konnten durch Untersuchungen weitgehend ausgeräumt werden, da bei intakter zellulärer Immunität kein dauerhaftes Engraftment der malignen Zellen beobachtet wurde.²⁸ Da die Spender unbehandelt sein mussten, um den Vorteil der hohen Zellzahlen aufzuweisen, begründeten ethische Bedenken die Abkehr von einer systematischen Nutzung dieses Spenderkollektivs, das zudem recht klein und somit nicht allgemein verfügbar war.

1.3.2. Stimulation

Verschiedene Pharmaka wirken steigernd auf die Anzahl zirkulierender Granulozyten. Kortikosteroide erhöhen die Emigration von Granulozyten aus dem Knochenmark und vermindern zugleich die Migration ins Gewebe.²⁹ Lange Zeit waren sie Mittel der Wahl bei der Granulozytenspende und da die verwendeten Dosen niedrig und die Verabreichung nur anlässlich von Spenden stattfand, wurde angenommen, dass die Nebenwirkungen keine Gefahr für den Spender darstellen würden. Ein erhöhtes Auftreten von Katarakten ist bei regelmäßiger Gabe von Kortikosteroiden beschrieben, wurde aber beim punktuellen Einsatz zur Granulozytenspende nicht erwartet. Dass dies doch der Fall sein kann, wie jüngere Untersuchungen nahe legen,³⁰ hat den Einsatz von Steroiden in Frage gestellt.

Einen anderen Weg zum Ziel der Granulozytenstimulation stellt G-CSF dar, das seit den späten 1980er Jahren zur Verfügung steht und eine deutliche Granulozytose

induziert. Diese Wirkung gestaltet die Granulozytapherese deutlich effektiver und hat G-CSF trotz fehlender Zulassung für diese Anwendung unverzichtbar gemacht.

Die Wirkungen von G-CSF und Kortikosteroiden auf die zirkulierende Granulozytenzahl addieren sich durch ihre unterschiedlichen Wirkmechanismen und wurden vielfach zusammen genutzt.³¹

1.3.3. Kriterien

Die Anforderungen an Herstellung und Anwendung von Granulozytenkonzentraten werden in Deutschland durch die „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“ vorgegeben.³² Sie wurden von der Bundesärztekammer unter Zustimmung des Paul-Ehrlich-Instituts erarbeitet. Hier finden sich Vorgaben für die Spenderauswahl und –sicherheit, Präparation, Lagerung und die Qualitätskontrolle nach der aktuellen Studienlage.

1.3.3.1. Spenderauswahl

Für die Granulozytenspende gelten die gleichen Voraussetzungen wie für die Vollblutspende in Hinsicht auf die Sicherheit von Spender und Empfänger. Neben allgemeiner Gesundheit sind die anamnestische Erhebung von Vorerkrankungen und ein Screening für infektiologische Marker von besonderer Bedeutung, werden doch die hergestellten Präparate immuninkompetenten Empfängern transfundiert.

Im Rahmen der gerichteten Spende können in Einzelfällen Ausnahmen unter gesondertem Hinweis auf die möglicherweise erhöhten Risiken für Spender und Empfänger gemacht werden. Eine Abwägung der Risiken eines Verzichts auf eine Transfusion und der möglichen Komplikationen einer Spende und folgender Transfusion ist im Einzelfall von den behandelnden Ärzten, den mit der Herstellung betrauten Ärzten sowie mit Spender und Empfänger vorzunehmen.

Bei der Granulozytenspende sind Empfängermerkmale wie die Blutgruppe im ABO- und Rh-System, unter Umständen auch HLA-Merkmale oder antigranulozytäre Antikörper des Empfängers zu berücksichtigen. Bei CMV-negativen Empfängern soll der Spender ebenfalls CMV-AK-negativ sein, da es in Einzelfällen zur Infektion und Erkrankung des Empfängers durch Granulozytensubstitution gekommen ist.^{33,34}

Die Aufklärung des Spenders ist ausführlich durchzuführen und zu dokumentieren und umfasst neben der üblichen Erklärung der Technik und der möglichen unerwünschten Ereignisse insbesondere die Anwendung der zur

Granulozytapherese notwendigen Pharmazeutika, und zwar HAES, G-CSF und ggf. Kortikosteroide. So muss für HAES auf seltene allergische Reaktionen und Juckreiz und beim G-CSF auf Kopf-, Knochen- und Muskelschmerzen und Müdigkeit sowie möglicherweise unbekannte Langzeitwirkungen hingewiesen werden.

1.3.3.2. Spendersicherheit

Zur Sicherheit des Spenders wird maximal eine Woche vor der Granulozytapherese eine Voruntersuchung durchgeführt, in der neben Anamnese und körperlicher Untersuchung auch Laboruntersuchungen durchgeführt werden. Leukozytenzahl und Differenzierung sollen im Normalbereich liegen und werden unmittelbar vor der Spende kontrolliert. Die Gesamtleukozytenzahl soll nach der Mobilisierung nicht über 70 000 / μ l liegen. Thrombozytenzahl und Hämoglobinwert bzw. Erythrozytenzahl sollen ebenfalls im Normalbereich liegen, da auch Zellen beider Reihen durch den Apheresevorgang dem Spender verlorengehen. Bei Spendezyklen in kurzer Abfolge ist sowohl der Verlust von roten Zellen und Plättchen zu beachten als auch die verstärkte Wirkung des G-CSF mit steigenden Leukozytenzahlen. Beim Einsatz von Glukokortikoiden soll bei der Voruntersuchung auf den Blutzuckerspiegel geachtet werden.

1.3.3.3. Präparation

Die präparative Granulozytapherese erfordert den Einsatz von nebenwirkungsbehafteten Medikamenten und komplexen Geräten, die bei unsachgemäßer Anwendung eine ernsthafte Gefahr für das Wohlergehen des Spenders darstellen können. Die Herstellung von Granulozytenkonzentraten ist daher unter ärztlicher Aufsicht und nur durch Personal durchzuführen, das über Erfahrung mit extrakorporalen Systemen verfügt, hier seien insbesondere evtl. erforderliche Notfallmaßnahmen, Kenntnisse zur Erkennung und Behebung von Störungen sowie die ordnungsgemäße Vorbereitung der Geräte erwähnt.

1.3.3.4. Lagerung

Granulozytenkonzentrate sind für die sofortige Transfusion vorgesehen. Eine Lagerung über die Dauer der Qualitäts- und Sicherheitstestungen ist nur für maximal 24 Stunden vorgesehen.³⁵ Untersuchungen über die Aktivität der gespendeten Granulozyten über 48 Stunden hinaus wurden zwar durchgeführt³⁶, doch muss eine

möglichst rasche Transfusion weiterhin als Ziel angesehen werden, soll die Funktion der Granulozyten möglichst wenig beeinträchtigt sein.

1.3.3.5. Qualitätskontrolle

Ein Granulozytenkonzentrat soll bei einem Volumen von nicht mehr als 500 ml mindestens 1×10^{10} Granulozyten enthalten. Diese Vorgaben spiegeln in Anbetracht der großen Verschiedenartigkeit der Empfänger die Schwierigkeit wider, die der Granulozytentransfusion anhängt. Für die Wirkung von transfundierten Granulozyten konnte eine Dosis-Wirkungsbeziehung nachgewiesen werden³⁷, die eine möglichst hohe Granulozytenzahl in jedem Konzentrat wünschen lässt. So wird in den Richtlinien zur Hämotherapie der Bundesärztekammer für erwachsene Empfänger eine Zahl von 1×10^{10} transfundierten Granulozyten pro Tag, und damit möglichst auch pro Präparat, als Untergrenze angegeben. Kenndaten des fertigen Produktes sind neben dem Volumen die Leukozytenzahl und der Granulozytenanteil, bzw. die absolute Granulozytenzahl als direktem Wert, außerdem der Gehalt an Thrombozyten und roten Blutkörperchen bzw. Hämoglobingehalt.

1.4. Ziel der Studie

1.4.1. Arzneimittelsicherheit

G-CSF ist für die Stimulation von Granulozyten zur präparativen Apherese nicht zugelassen. Die relativ geringe Häufigkeit solcher Spenden und die niedrige verwendete Dosierung lassen ein Zulassungsverfahren angesichts des Verwaltungs- und Finanzaufwandes wenig lukrativ für die Hersteller erscheinen. Aufgrund fehlender Alternativen wird G-CSF dennoch für die Granulozytenmobilisierung eingesetzt. Zur Einschätzung der mit der Anwendung verbundenen Risiken und Nebenwirkungen sind daher Untersuchungen des Stimulations- und Spendevorgangs mit einer Langzeitüberwachung der Spender unerlässlich.

1.4.1.1. Bisherige Studienlage

G-CSF ist zur Anwendung am Gesunden nur für die Vorbereitung zur Stammzellspende aus peripherem Blut (PBSC) erprobt und zugelassen. Hier liegt die Dosierung bei $10 \mu\text{g}/\text{kg KG}$ täglich über 4-5 Tage³⁸ und wird teilweise noch weiter erhöht.³⁹ Bei dieser Dosierung werden regelmäßig Nebenwirkungen beschrieben, wenn auch sehr selten schwere. Die häufig auftretende Splenomegalie kann sich

durch eine sehr selten vorkommende spontane Milzruptur lebensbedrohlich komplizieren.^{40,41,42} Auch das Auftreten von hämatologischen Malignomen ist nach der Anwendung von G-CSF im Rahmen der PBSC beobachtet worden, allerdings konnte bisher Kausalität weder nachgewiesen noch ausgeschlossen werden.^{43,44}

Vor dem Hintergrund schwerwiegender Risiken ist ein unbesehener Einsatz von G-CSF bei einer für den Spender durchaus vermeidbaren Prozedur nicht ohne weitere Untersuchungen vertretbar. Da bei der Granulozytenspende auch unverwandte Spender herangezogen werden und die Evidenz für die Wirksamkeit von Granulozytentransfusionen zunimmt, sind die Wirkungen, Nebenwirkungen und Risiken der G-CSF Anwendung von besonderem Interesse.

So standen zunächst die Wirkungen und Dosierungen von G-CSF im Vordergrund, und es wurden auch Beobachtungen über die vom Spender berichteten Nebenwirkungen erhoben.⁴⁵ Weiterhin wurden Veränderungen des Blutbilds und verschiedener Laborparameter untersucht.⁴⁶ Obwohl alle G-CSF zugeschriebenen Veränderungen sich nach etwa 4 Wochen wieder normalisierten^{47,48}, erscheinen Langzeitwirkungen von G-CSF nicht völlig geklärt, auch wenn einige Untersuchungen zu diesem Thema durchaus vorgenommen wurden^{49,50}.

1.4.2. Spendersicherheit

Die Granulozytenspende ist freiwillig und der gesunde Spender nimmt eine Reihe von Ungewissheiten in Bezug auf Nebenwirkungen und mögliche Komplikationen auf sich, die für eine sinnvolle Risikoabwägung möglichst genau bekannt sein sollen. Diese Risiken schließen die Anwendung verschiedener Pharmaka ein und die Einrichtung eines extrakorporalen Kreislaufs. Ziel der Studie war es, insbesondere die Wirkungen und Nebenwirkungen der relativ neuen G-CSF-Präparate zu erfassen. Doch daneben sollte auch der Prozess der Zellseparation erfasst werden. Der langfristigen Beobachtung der Spender wurde besondere Bedeutung zugemessen, da hierzu am wenigsten Daten vorliegen.

1.4.3. Zuverlässigkeit im Spendeverfahren

Bei der Etablierung einer Therapie, hier der Granulozytentransfusion, müssen unter anderem zuverlässig Präparate mit möglichst gleich bleibenden Eigenschaften hergestellt werden. Ein weiteres Ziel dieser Studie war es daher, den Herstellungsprozess mit den Eckdaten der einzelnen Abläufe zu erfassen und über eine möglichst große Anzahl von Spendezentren, Spendern und Präparaten die

routinemäßige Anwendung der Technik zu dokumentieren. Die kurze Lagerungsfähigkeit von Granulozyten, die derzeit seltene Anwendung, die sehr begrenzte Anzahl von erlaubten Spendevorgängen pro Spender und der hohe damit verbundene Aufwand machen den Erfolg des einzelnen Spendevorgangs zur Voraussetzung für einen weiteren Einsatz dieser Technik. Ausfälle einzelner Spenden führen fast immer auch zu einem Ausfall der angestrebten Transfusion, da die Vorlaufzeit für eine Spende durch die Rekrutierung des Spenders, dessen Stimulation und den Spendevorgang selbst in der Regel mindestens 24 Stunden benötigen.⁵¹ Die Zuverlässigkeit des derzeit angewandten Verfahrens sollte daher von der Stimulation bis zum fertigen Produkt untersucht werden, um eine klinische Anwendung auf sicheren Grund zu stellen.

2. Material und Methoden

2.1. Studiendesign und Ablauf der Studie

2.1.1. Grundsätzliche Überlegungen und Planung

Die vorgenannten Fragestellungen stellen einige Anforderungen an eine Studie zu ihrer Klärung. Um eine möglichst große Anzahl von Spendern und Spendevorgängen zu erfassen, wurden möglichst viele Spendezentren mit einbezogen. Angefragt werden sollten möglichst viele Blutspendezentren, die mit dem Verfahren der Granulozytenspende bereits vertraut waren.

Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der „Declaration of Helsinki“, den Richtlinien zu „Good Clinical Practice“ der Europäischen Arzneimittelagentur EMA und den Anforderungen der BfArM (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte) konzipiert. Denn für den Einsatz von G-CSF zur Konditionierung von Granulozytenspendern besteht auch international keine Zulassung. Der Umstand, dass diese Substanz Gesunden verabreicht wird und dass dies nicht im eigenen Interesse erfolgt, macht also die Prüfung der Studie sowohl konzeptionell durch die entsprechende Bundesbehörde sowie durch eine Ethikkommission notwendig. Zudem wurde die Studie auch an den einzelnen Prüfzentren den entsprechenden Gremien zur Begutachtung vorgelegt. Diese erfolgte nach ethischen Gesichtspunkten, aber auch nach medizinisch-wissenschaftlichen und rechtlichen.

Die Studie wurde von der „Sektion Präparative und Therapeutische Hämapherese“ der DGTI (Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie) gefördert.

2.1.2. Globale Fragestellungen

2.1.2.1. Studienziel Zuverlässigkeit des Verfahrens

Um die Zuverlässigkeit des Verfahrens der präparativen Granulozytapherese nach Vorbehandlung mit G-CSF zu zeigen, wurde als erster messbarer Parameter der Stimulationserfolg gewählt. Als Maß des Erfolgs der Stimulation der Spender wurde die Leukozytenzahl vor Beginn des Spendevorgangs gewertet. Die Untersuchung dieses Parameters zielt auf die Zuverlässigkeit des der Studie zugrunde liegenden Stimulationsprotokolls ab.

Ein weiterer Parameter, der untersucht werden sollte, ist der Erfolg der Zellseparation. Als Maß für den Erfolg des gesamten Spende- und Herstellungsprozesses wurde die absolute Granulozytenzahl im fertigen Produkt gewertet.

Faktoren, die einen Einfluss auf diese beiden Kennwerte der Granulozytenspende haben, könnten zum einen demographische Daten des Spenders bilden, wie das Alter, Geschlecht und der Ort, an dem die Spende durchgeführt wird, im Folgenden als Spendezentrum bezeichnet. In der Studie wurden zwei verschiedene G-CSF-Präparate eingesetzt, auch diese könnten einen Einfluss auf die gewählten Zielgrößen ausüben. Weiterhin ist ein Zusammenhang der beiden Parameter denkbar. Auch die häufig durchgeführte mehrfache Spende in kurzen Intervallen, die Aphereseserie, kann auf die Ergebnisse von Stimulation und Separation einen Einfluss ausüben.

Für die Zuverlässigkeit des Verfahrens ist jedoch nicht nur von Bedeutung, wie erfolgreich Stimulation und Separation sind, sondern auch, wie oft der Prozess der Stimulation und Spende erfolgreich ist, also für den Empfänger ein Präparat bereitgestellt werden kann.

2.1.2.2. Studienziel Arzneimittelsicherheit

Das den Spendern verabreichte G-CSF sollte auf seine Sicherheit und Verträglichkeit hin untersucht werden. Die Nebenwirkungen des G-CSF sind bekannt und sollten von dem Spendern in einem standardisierten Fragebogen nach der Stimulationsbehandlung abgefragt werden. Als aufgetretene Nebenwirkung wird im Folgenden das Auftreten einer oder auch mehrerer berichteter Nebenwirkungen bezeichnet, wie sie von den Spendern genannt wurde.

Faktoren, die einen Einfluss auf das Auftreten von Nebenwirkungen haben könnten, sind das Alter, Geschlecht, Spendezentrum, der verabreichte G-CSF-Typ, aber auch die genaue Dosis, die dem Spender verabreicht wurde und der Erfolg der Stimulationsbehandlung. Auch wiederholtes Spenden wie bei einer Aphereseserie könnte das Auftreten von Nebenwirkungen beeinflussen.

Eventuelle Langzeitwirkungen durch Nachuntersuchungen erfasst.

2.1.2.3. Studienziel Spendersicherheit

Als wesentlicher Teil der Spendersicherheit ist bereits die Sicherheit des G-CSF behandelt worden. Zusätzlich zu diesem Aspekt wurden Spendeabbrüche mit

Begründung, Komplikationen beim Spendevorgang und Auffälligkeiten in den Nachuntersuchungen erfasst.

2.1.3. Studienpopulation

2.1.3.1. Einschlusskriterien

Spender wurden in die Studie aufgenommen, wenn sie nach den gültigen Richtlinien der Bundesärztekammer für die Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen für eine Spende geeignet waren. Allgemeine Gesundheit wurde durch eine gründliche Anamnese genauso wie durch eine körperliche Untersuchung und laborchemische Untersuchungen festgestellt.

Im Falle der Verwandtenspende wurde in Einzelfällen erwogen, Spender zuzulassen, die nicht alle Kriterien der Bundesärztekammer erfüllten, ein regelrechter aktueller Gesundheitszustand wurde jedoch im Spenderinteresse zur Grundbedingung für eine Aufnahme in die Studie gelegt.

2.1.3.2. Ausschlusskriterien

Spender wurden nicht in die Studie aufgenommen, wenn die allgemeine Spendetauglichkeit nicht gegeben war oder wenn Herz- und Kreislauferkrankungen, eine eingeschränkte renale Funktion oder neurologische bzw. Krampfleiden bestanden. Selbstverständlich hatte jeder Spender auch die Möglichkeit einer Spende ohne Aufnahme in die Studie und zum Ausstieg zu jedem beliebigen Zeitpunkt ohne Angabe von Gründen.

2.1.4. Geplanter Stichprobenumfang

Der geplante Stichprobenumfang betrug 400 Spender.

2.1.5. Rekrutierung von Spendezentren und Prüfärzten

Um ein möglichst großes Spenderkollektiv und möglichst viele Spende- und Herstellungsprozesse zu erfassen, wurden 17 Blutspendeeinrichtungen im Bundesgebiet um ihre Beteiligung gebeten, neben der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Gießen als Studienzentrale waren dies die Blutspendeeinrichtungen in Aachen, Berlin, Essen, Frankfurt am Main, Halle, Hamburg, Jena, Leipzig, Lübeck, Mannheim, Marburg, München, Münster, Ratingen, Regensburg, Stuttgart und Ulm. Von diesen Zentren entsprachen 13 der Bitte um

Mitarbeit, und zwar die in Berlin, Essen, Frankfurt am Main, Halle, Hamburg, Jena, Leipzig, Lübeck, Mannheim, Marburg, Münster, Regensburg, und Ulm.

Den Prüfarzten an den jeweiligen Blutspendediensten wurde ein Handbuch zur Verfügung gestellt. Es enthielt Informationen für die Prüfarzte, so das Studienprotokoll, Fachinformationen zu den verwendeten Medikamenten, gesetzliche Bestimmungen und behördliche Genehmigungen, das Votum der Ethikkommission sowie den Nachweis der Probandenversicherung, Vorlagen zur Datenerfassung und Spenderaufklärung und –einwilligung. Im Verlauf der Studie wurden hier ebenfalls unerwünschte Ereignisse dokumentiert und Studienberichte sowie die relevante Korrespondenz gesammelt. Die Studie wurde nicht gemonitort.

2.1.6. Rekrutierung von Spendern

Als Spender im Rahmen dieser Studie wurden alle den Blutspendeeinrichtungen zur Verfügung stehenden Granulozytenspender um ihre Mitarbeit gebeten. Dies schließt Familienmitglieder der Empfänger ein wie auch unverwandte Spender, die aus der Spenderkartei der Blutspendeeinrichtungen zur Spende von Granulozyten gebeten wurden.

Eine ausführliche Aufklärung über den Spendevorgang und die mit den verabreichten Medikamenten möglicherweise verbundenen Risiken und Nebenwirkungen erhielt der Spender mündlich und schriftlich. Ausdrücklich wurden die Spender auf die noch nicht endgültig geklärten Risiken bei der Anwendung von G-CSF hingewiesen und darauf, dass ihre Spende im Rahmen dieser Studie im Einklang mit den Bestimmungen des Datenschutzes erfasst und ausgewertet würde. Um eventuelle Risiken für teilnehmende Spender absichern zu können, wurde im Rahmen einer Probandenversicherung entsprechend vorgesorgt. Ihr Einverständnis erklärten die Spender mit einer eigenhändig unterschriebenen Erklärung, die obige Punkte enthielt.

2.1.7. Dauer der Studie

Die Laufzeit der Studie sollte ab dem Jahr 2000 drei Jahre dauern, so dass nach etwa fünf Jahren auch die letzten Spender der Zwei-Jahres-Nachuntersuchung unterzogen werden konnten und die Studiendaten vollständig vorliegen konnten. Vor dem Ablauf der ursprünglich geplanten Studiendauer wurde eine Verlängerung der Studie vorgenommen, um die Anzahl der eingeschlossenen Spender zu erhöhen. Nach zusätzlichen zwei Jahren wurde die Aufnahme neuer Spender in die Studie

eingestellt. Laut Studienprotokoll wurden daher im Jahr 2007 die letzten Nachuntersuchungen durchgeführt und konnten der Auswertung zugeführt werden.

2.1.8. Studienablauf

2.1.8.1. Voruntersuchung

Die Spendereingangsuntersuchung dient zunächst zur Feststellung, ob alle Einschlusskriterien erfüllt und kein Ausschlussgrund vorliegt. Zusätzlich zu der oben genannten Anamnese und Untersuchung wurde für die Granulozytenspende umfangreiche Labordiagnostik durchgeführt. Es wurden Blutgruppenserologie und Infektionsmarker bestimmt, ein Blutbild mit Leukozytendifferenzierung, außerdem die Leber- und Retentionswerte, Elektrolyte, Gerinnung, Blutzucker und Gesamteiweiß. Ein Urinstatus mittels Teststreifen und ein Schwangerschaftstest bei Frauen im fertilen Alter vervollständigten die Labordiagnostik.

Die Voruntersuchung wurde höchstens 7 Tage vor der ersten Apherese durchgeführt und bei einer Serie von Apheresen nur vor der ersten. Sie stellt auch den Zeitpunkt der Aufklärung durch den spendeverantwortlichen Arzt und der schriftlichen Einwilligung des Spenders zur Teilnahme an der Studie.

Die Dokumentationsvorlage zur Voruntersuchung findet sich im Anhang (8.1.1).

2.1.8.2. Stimulation

Bei Zeitpunkt und Frequenz der Granulozytenspende kann es naturgemäß kein einheitliches Vorgehen geben, da jedes Präparat gezielt für einen Empfänger hergestellt wird und dessen Bedarf sich nach seinem klinischen Zustand richtet. Dennoch haben sich einige Spenderrhythmen durchaus bewährt. So findet in vielen Zentren die Stimulation des Spenders am Vorabend der Spende statt, so dass die 12 Stunden zwischen Konditionierung und Spende in die Nacht fallen und die Spende mit der personalaufwändigen Verarbeitung und Transfusion des Produkts tagsüber erfolgen kann. Hinsichtlich der Spendefrequenz haben sich Aphereseserien von bis zu vier Spendevorgängen bewährt, die entweder täglich oder an jedem zweiten Tag durchgeführt werden.

Zur Stimulation wurde G-CSF eingesetzt, und zwar beide zur Verfügung stehenden Präparate Lenograstim (Granocyte®) und Filgrastim (Neupogen®). Als Standarddosis wurde die Gabe von 5 µg/kg gewichtsadaptiert subcutan festgelegt. Optional und in Verantwortung der einzelnen Spendezentren konnten auch

Kortikosteroide gegeben werden. Als Standard in das Stimulationsprotokoll wurden Steroide jedoch aufgrund eines möglichen Zusammenhangs zum Auftreten von Katarakten nicht aufgenommen werden. Ziel der Stimulation war eine Granulozytenzahl von 20 000 – 60 000 / μ l, bei Überschreiten von 70 000 / μ l wurde in einer Aphereseserie mit der Stimulation pausiert, da eine stark erhöhte Leukozytenzahl eine Hyperviskosität des Blutes hervorruft, die zu Gefäßverschlüssen, Priapismus oder auch einer pulmonalen Leukostase führen kann.

Das Stimulationsprotokoll ist somit hinsichtlich des Transfusionsbedarfs und Zeitpunkts der Spende flexibel gestaltet, jedoch wurden wichtige Parameter einheitlich vorgegeben, so das Stimulations-Spende-Intervall und die G-CSF-Dosierung.

Die gemeinsame Dokumentationsvorlage zur Stimulation und zum Spendevorgang findet sich im Anhang (8.1.2).

2.1.8.3. Dokumentation des Spendevorgangs

Am Tag der Apherese wurde von jedem Spender ein Blutbild vor der Spende abgenommen, um den Erfolg der Stimulation zu erfassen.

Weiterhin erfasst wurde der Typ Apheresemaschine, hier stehen grundsätzlich zwei Typen zur Verfügung, die unterschiedliche Verfahren zur Prozessierung des Spenderbluts nutzen: *Intermittent-flow* Geräte der Firma Fresenius und *continuous-flow* Maschinen der Firma Cobe. Wichtige Kenndaten des Apheresevorgangs wurden ebenfalls protokolliert und umfassen die Dauer der Apherese, das prozessierte Volumen, Art und Verbrauch von HAES und sowie Tricitrasol.

Das hergestellte Präparat wurde charakterisiert durch sein Volumen sowie den Gehalt von Leukozyten und der Granulozytensubpopulation sowie Thrombozyten und Erythrozyten im Präparat.

Etwaige Komplikationen oder Abbruchgründe des Spendevorgangs wurden ebenfalls erfasst.

Die gemeinsame Dokumentationsvorlage zur Stimulation und zum Spendevorgang findet sich im Anhang (8.1.2).

Nach erfolgter Spende wurde anhand eines standardisierten Fragebogens nach Nebenwirkungen gefragt, die Spender seit der Stimulation bemerkt hatten. Hierbei wurden die bekannten Nebenwirkungen von G-CSF aber auch Juckreiz, der eine wichtige Nebenwirkung von HAES darstellt, abgefragt. Beschwerden, die keiner der

zur Verfügung stehenden Kategorien zugeordnet werden konnten, wurden als Freitext dokumentiert.

Abschließend wurde der Spender gefragt, ob er in der Zukunft erneut bereit wäre, sich G-CSF verabreichen zu lassen und nochmals Granulozyten spenden würde.

Die Dokumentationsvorlage für die aufgetretenen Nebenwirkungen findet sich im Anhang (8.1.3).

2.1.8.4. Nachuntersuchungen

Im Rahmen der Erfassung von langfristigen Auswirkungen von G-CSF wurden alle Spender gebeten, sich zu zwei Zeitpunkten einer Nachuntersuchung im Spendezentrum zu unterziehen. Die erste Nachuntersuchung fand 2 – 4 Wochen nach der letzten erfolgten Spende statt. Zu diesem Zeitpunkt sollten akute Nebenwirkungen nachgelassen haben. Die letzte Nachuntersuchung wurde zwei Jahre nach der letzten erfolgten Spende durchgeführt. Ziel dieser Nachuntersuchung war es, langfristige Veränderungen oder Nebenwirkungen zu erfassen.

Die Inhalte beider Nachuntersuchungen waren identisch. Es wurde eine Anamnese erhoben, in der offen nach neu aufgetretenen Erkrankungen oder Beschwerden und gezielt nach möglichen Nebenwirkungen des G-CSF gefragt wurde. Die körperliche Untersuchung wurde von Laboruntersuchungen ergänzt. Es wurden dieselben Parameter untersucht wie bei der Spendereingangsuntersuchung, auf einen Schwangerschaftstest und die Blutgruppenserologie wurde jedoch verzichtet.

Die Dokumentationsvorlage für die Nachuntersuchungen findet sich im Anhang (8.1.4).

2.1.9. Durchführung der Studie

Die Laufzeit der Studie sollte ab dem Jahr 2000 drei Jahre dauern, so dass nach etwa fünf Jahren auch die letzten Spender der Zwei-Jahres-Nachuntersuchung unterzogen werden konnten und die Studiendaten vollständig vorliegen konnten. Vor dem Ablauf der ursprünglich geplanten Studiendauer wurde eine Verlängerung der Studie vorgenommen, um die Anzahl der eingeschlossenen Spender zu erhöhen. Nach zusätzlichen zwei Jahren wurde die Aufnahme neuer Spender in die Studie eingestellt. Laut Studienprotokoll wurden daher im Jahr 2007 die letzten Nachuntersuchungen durchgeführt und konnten der Auswertung zugeführt werden.

2.2. Analyse der Daten

Die bei der Studie gesammelten Daten wurden zentral in Gießen gesammelt, archiviert und elektronisch erfasst. Hierfür wurde eine Datenmatrix mit dem Programm MS Excel erstellt und alle eingehenden Datensätze wurden hier eingepflegt. Die statistische Auswertung erfolgte mit SAS V9.1.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Fehlende Daten wurden bei den Prüfzentren zweimalig nachgefordert. Danach wurden sie als fehlend betrachtet.

2.2.1. Deskriptive Statistik

Das Spenderkollektiv wird hinsichtlich Alter, Geschlecht und eingesetztem G-CSF-Typ nach Zentren getrennt charakterisiert. Angegeben werden jeweils das Minimum und Maximum, das erste und dritte Quartils sowie der Median.

Die erfassten Daten aus dem Stimulations- und Separationsvorgang werden ebenfalls mit Minimum und Maximum, erstem und drittem Quartil und dem Median beschrieben. Sie werden der Übersichtlichkeit halber aus dem der Datenauswertung zugeführten Kollektiv angegeben. Die beiden Zielvariablen Stimulationserfolg und Separationserfolg werden nach Spendezentrum, eingesetztem G-CSF-Typ und Geschlecht mit Minimum und Maximum, erstem und drittem Quartil, und dem Median beschrieben.

Aufgetretene Nebenwirkungen wurden in insgesamt 14 Kategorien nach jeder Stimulation abgefragt. Die Ergebnisse aller Stimulationen aller Zentren werden als absolute Häufigkeiten in den einzelnen Kategorien wiedergegeben. Außerdem wird für die erste Spende aller Spender untersucht, ob der Spender irgendeine oder mehrere Nebenwirkungen verspürt hat. Letztere Ergebnisse werden nach Spendezentrum und Geschlecht getrennt dargestellt.

Die Ergebnisse der beiden Nachuntersuchungen werden als Häufigkeiten getrennt nach Spendezentren angegeben. Es werden jeweils pathologische Ergebnisse in den Klassen Veränderungen des weißen Blutbilds, Veränderungen bei anderen Laborwerten, Auftreten von Nebenwirkungen des G-CSF, sonstige klinische Beschwerden und Anderes angezeigt.

2.2.2. Inferenzstatistik

Die Analyse der beobachteten Daten erfolgt im explorativen Sinn, d.h. die unter der Annahme, dass kein Unterschied bzw. Zusammenhang vorliegt, berechnete Wahrscheinlichkeit für das beobachtete oder ein extremeres Ereignis kann als ein Maß für die Reproduzierbarkeit bzw. Evidenz der Ergebnisse angesehen werden.

Zur Überprüfung der Fragestellung, welche Faktoren einen Einfluss auf den Stimulations- bzw. Separationserfolg oder auf das Auftreten unerwünschter Ereignisse haben könnten, wurden als mögliche Einflussfaktoren das Alter, das Geschlecht, C-GSF-Typ, das Spendezentrum, der Stimulationserfolg selbst, die dem Spender verabreichte G-CSF-Dosis und bei Mehrfachspenden die Zahl der Spende bei der Analyse berücksichtigt. Dazu mussten die stetigen möglichen Einflussvariablen klassifiziert werden.

2.2.2.1. Klassifizierung der Einflussvariablen

Das Alter der Spender ist eine mögliche Einflussvariable und wurde für die statistische Auswertung in vier Klassen geteilt.

Klasse	Alter
1	Unter 30 Jahren
2	30 – 39 Jahre
3	40 – 49 Jahre
4	Über 50 Jahre

Tabelle 1 - Klassifizierung des Alters

Die verabreichte G-CSF-Dosis wurde im Stimulationsprotokoll gewichtsadaptiert vorgegeben. Bedingt durch die angebotenen Darreichungsformen und daraus resultierenden Schwierigkeiten bei der exakten Dosierung schwankte die tatsächlich verabreichte G-CSF-Dosis beträchtlich. Für die Untersuchung dieses Einflusses auf die Zielvariablen wurden Klassen gebildet.

Klasse	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg KG}$)
1	≤ 4
2	$4 < x < 6$
3	≥ 6

Tabelle 2 - Klassifizierung der G-CSF-Dosis

Da der Stimulationserfolg im Zusammenhang mit dem Auftreten von Nebenwirkungen stehen könnte, wurde diese stetige Variable in vier Klassen nach den Quartilen geteilt.

Klasse	WBC (5×10^9 WBC/l)
1	$\leq 21,5$
2	$21,5 < x \leq 26,1$
3	$26,1 < x \leq 30,6$
4	$> 30,6$

Tabelle 3 - Klassifizierung des Stimulationserfolgs

Unter den diskreten Einflussvariablen wurde das Geschlecht in den Ausprägungen männlich und weiblich und der G-CSF-Typ nach den eingesetzten Präparaten Lenograstim und Filgrastim betrachtet.

Eine weitere diskrete Einflussvariable stellt das Spendezentrum dar. Da einige Zentren nur wenige Spender rekrutiert hatten, wurden für einige Fragestellungen sechs der kleineren Spendezentren (Zentren 2, 4, 5, 8, 9, und 11) zu einem Zentrum zusammengefasst.

2.2.2.2. Eingesetzte Verfahren

Da von der Annahme der Normalverteilung nicht ausgegangen werden kann, wurden zur Überprüfung der Fragestellungen nichtparametrische Verfahren angewandt. Die einzige Ausnahme stellt der orientierende Einsatz der mehrfaktoriellen Varianzanalyse dar, deren Ergebnisse wurden jedoch alle mit nichtparametrischen Verfahren überprüft.

Zur Überprüfung von Unterschiedshypothesen wurde der Mann-Whitney-U-Test bzw. der Median-Test durchgeführt.

Zur Überprüfung von Zusammenhangshypothesen wurde bei stetigen Variablen der Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient berechnet und bei diskreten Variablen Methoden der Kontingenztafelanalyse angewandt.

Die Frage nach möglichen Unterschieden zwischen der Erst-, Zweit- und Drittspende wurde mit Hilfe der Friedman-Rang-Varianzanalyse und dem adäquaten Anschlussstest, der das globale Niveau für die Irrtumswahrscheinlichkeit einhält, überprüft.

2.2.2.3. Bildung von Subgruppen

Zur Überprüfung der einzelnen Fragestellungen mussten Subgruppenanalysen durchgeführt werden. So wurde die Frage nach möglichen Einflussfaktoren auf den Stimulations- bzw. Separationserfolg oder auf das Auftreten mindestens eines unerwünschten Ereignisses mit Hilfe der Daten, die bei der ersten Spende eines Spenders gewonnen wurden, überprüft. Für die Frage, welchen Einfluss die wiederholte Spende hat, wurden nur die Spender berücksichtigt, die mindestens dreimal gespendet haben.

Da es sich bei dieser Studie nicht um eine prospektive experimentelle Studie handelt, war die Verteilung der Ausprägungen der möglichen Einflussfaktoren in den einzelnen Studienzentren sehr unterschiedlich. Daher mussten für einzelne Fragestellungen Subgruppenanalysen durchgeführt werden.

3. Ergebnisse

3.1. Zusammensetzung des Spenderkollektivs

3.1.1. Spenderkollektiv

415 Spender wurden nach den im Studienprotokoll festgelegten Kriterien in die Studie eingeschlossen. Diese unterzogen sich insgesamt 1115 Stimulations- und Spendevorgängen. Dieses Kollektiv wurde für die Auswertung der Fragestellungen zu aufgetretenen Nebenwirkungen herangezogen.

Eine Übersicht über das Kollektiv gibt die Tabelle.

	Anzahl
Spender	415
Geschlecht	
Männer	348
Frauen	67
Alter	
unter 30	125
30 – 39	132
40 – 49	120
über 49	38
G-CSF-Präparat	
Lenograstim	200
Filgrastim	210
k. Angabe	5
Spendeanzahl	
1	92
2	92
3	101
4	119
5	11

Zentren	14	
	M	W
1	5	6
2	16	8
3	18	12
4	23	1
5	8	1
6	60	3
7	79	1
8	2	4
9	6	2
10	25	1
11	4	3
12	26	14
13	17	0
14	59	11

Tabelle 4 - Spenderübersicht

3.1.2. Subgruppe für die inferenzstatistische Untersuchung möglicher Einflussfaktoren

Zur Untersuchung der Einflussfaktoren auf aufgetretene Nebenwirkungen wurden die Datensätze von allen Spendern herangezogen. Die einzigen oder ersten Spenden in einem Spendezyklus wurden verwendet, um Einflüsse des Alters, Geschlechts, des Zentrums und des G-CSF-Typs zu untersuchen. Durch diese Vorgehensweise wird gleichzeitig eine mögliche Gewöhnung oder Akkumulation des G-CSF ausgeschlossen. Bei der Frage zum Einfluss einer wiederholten Spende wurden die Datensätze von Spendern mit mindestens drei Spenden ausgewertet.

Vom Gesamtkollektiv war ein Kollektiv von 330 Spendern geeignet, Fragen bezüglich der Einflussfaktoren auf die Zielvariablen Stimulations- und Separationserfolg zu beantworten. Es wurden nur solche Datensätze verwendet, die folgenden Kriterien entsprachen:

Die verabreichte G-CSF-Dosis liegt zwischen 3,3 µg/kg KG und 6,7 µg/kg KG. Vom Studienprotokoll waren 5 µg/kg KG vorgegeben, außer es wurden Leukozytenzahlen

> 70 000 / μ l überschritten. Die G-CSF-Dosis überschritt in 17 Fällen die Vorgabe und erreichte sie in 32 Fällen nicht.

Es erfolgte keine Gabe von Cortison im Stimulationsprotokoll. Dessen Gabe wurde vom Studienprotokoll zugelassen, jedoch mussten solche Datensätze aufgrund geringer Häufigkeit der Anwendung (n=16) und dem bekannten Einfluss auf den Stimulationserfolg ausgeschlossen werden.

Einsatz von Zellseparatoren vom Typ Cobe Spectra. Hier war ebenfalls die geringe Häufigkeit des Einsatzes von *intermittent-flow* Geräten der Firma Fresenius ein Grund für den Ausschluss, aber auch die Tatsache, dass durch den ausschließlichen Einsatz eines Zellseparatortyps an jedem Zentrum nur unzureichend zwischen Effekten des Separatortyps und Zentrumseffekten unterschieden werden konnte. So wurden die *continuous-flow* Geräte der Firma Cobe bei 380 Spendern eingesetzt, diejenigen der Firma Fresenius lediglich bei 28.

Das Prozessdiagramm zeigt die Auswahl der Spender wie oben beschrieben.

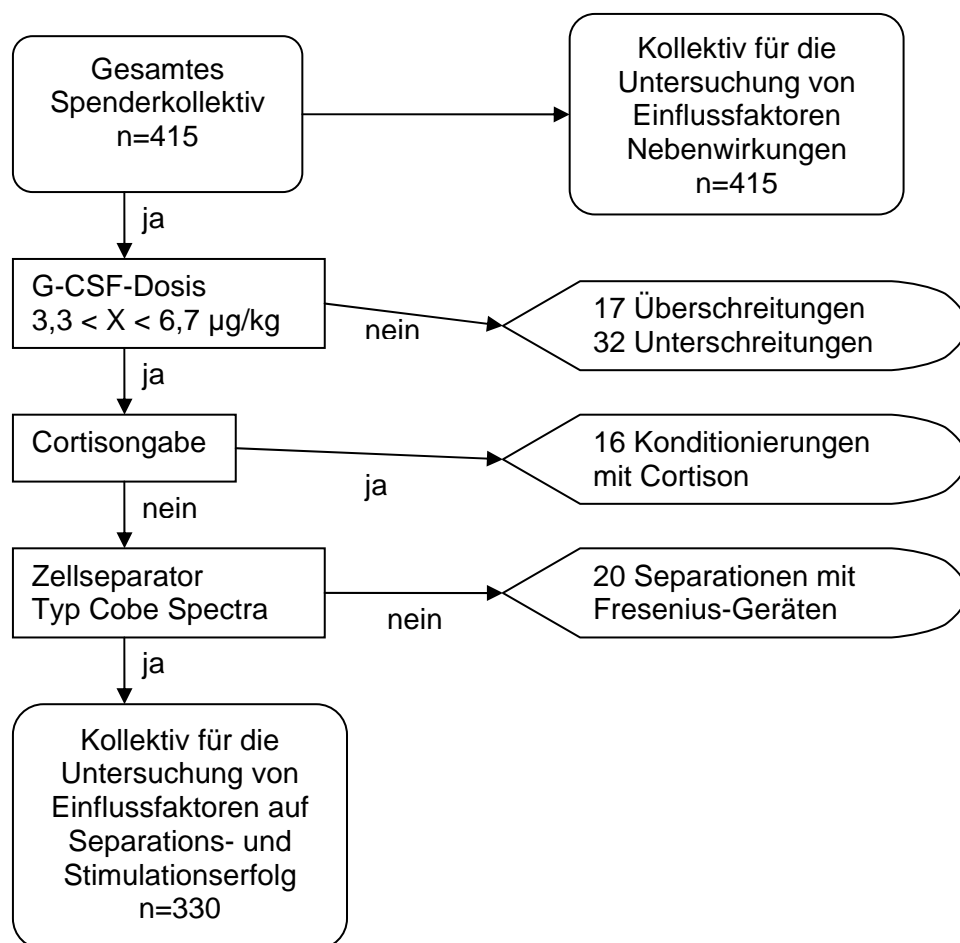


Abbildung 1 - Flussdiagramm Datenauswahl zur Untersuchung von Einflussfaktoren

Eine Übersicht über die Demographie dieses Spenderkollektivs gibt Tabelle.

	Anzahl	
Spender	330	
Geschlecht		
Männer	274	
Frauen	56	
Alter		
unter 30	87	
30 – 39	113	
40 – 49	99	
über 49	31	
G-CSF-Präparat		
Lenograstim	202	
Filgrastim	127	
k. Angabe	1	
Zentren	14	
	M	W
1	4	6
2	3	2
3	18	12
4	0	0
5	8	1
6	60	3
7	53	1
8	2	3
9	4	2
10	25	1
11	1	0
12	26	14
13	17	0
14	53	11

Tabelle 5 - Eingeschränktes Spenderkollektiv

3.2. Deskriptive Statistik

3.2.1. Zielvariable Stimulationserfolg

Vor jeder Granulozytapherese wurde vom Spender ein Blutbild angefertigt, dabei wurden die Parameter Leukozyten, Erythrozyten- und Thrombozytenzahl bestimmt. Als Stimulationserfolg wurde die Leukozytenzahl unmittelbar vor der Apherese betrachtet. Gezeigt werden die Leukozytenzahlen vor jeder Apherese im eingeschränkten Spenderkollektiv. Diese Übersicht ist in sofern nur mit Vorbehalt zu betrachten, da hier wichtige Einflussvariablen nicht beachtet werden. Eine Übersicht über den Stimulationserfolg, korrekt nach den Einflussvariablen gegliedert, findet sich im Anhang (Kap. 8.2.1). Der Boxplot stellt den Median (schwarzer Balken), das 25%-75%-Intervall (grauer Kasten) sowie Minimum und Maximum (T-Striche) dar.

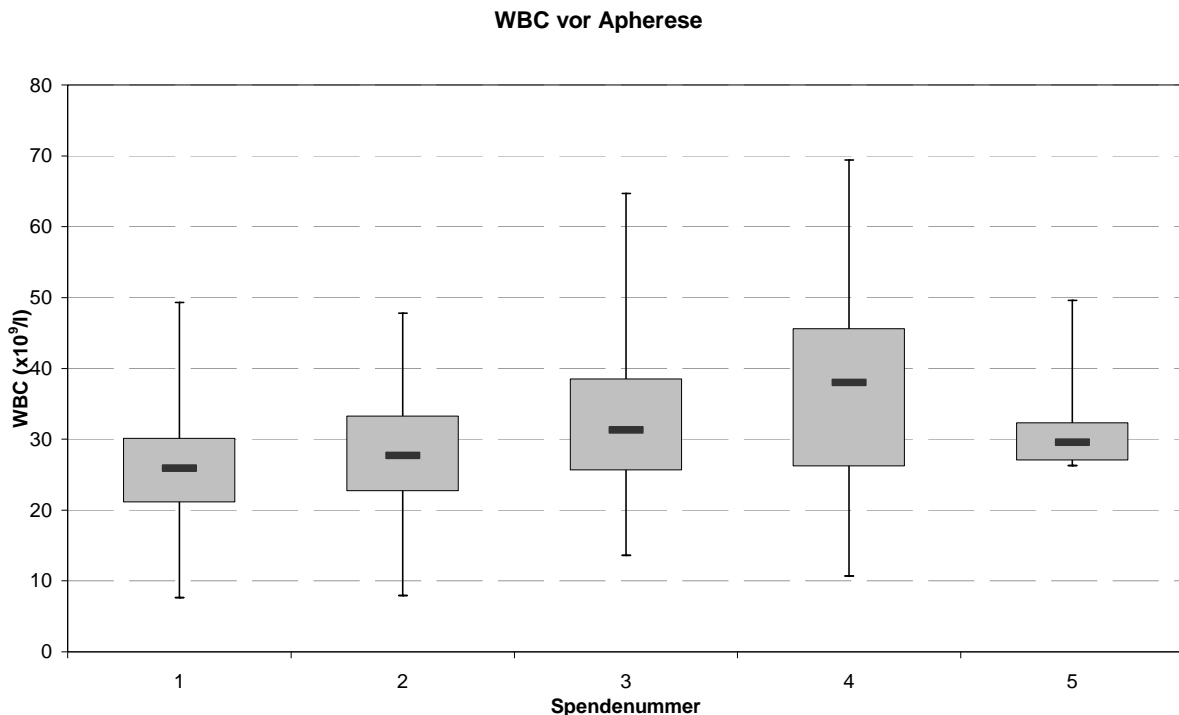


Abbildung 2 - Stimulationserfolg nach Spendezahl

Außerdem sollen hier exemplarisch für den jeweils ersten Spendevorgang die Ergebnisse der erstellten Blutbilder wiedergegeben werden, obwohl für die weitere Betrachtung des Stimulationserfolgs ausschließlich die Leukozytenzahl als Zielvariable dient.

Spenderblutbild vor der Apherese, 1. Spende						
	n	Minimum	Quartil 1	Median	Quartil 3	Maximum
RBC ($\times 10^{12}/l$)	314	1,0	4,57	4,81	5,08	5,93
THR ($\times 10^9/l$)	327	16,000	197	233	272	421
WBC ($\times 10^9/l$)	327	7,63	21,1	25,9	30,1	49,3

Tabelle 6 - Spenderblutbild vor erster Apherese

Die nachfolgende Untersuchung von relevanten Einflussvariablen auf den Stimulationserfolg ergab durchaus Einflüsse besonders des Spendezentrums und des Geschlechts. Daher wird im Anhang (Kap. 8.2.1) die Verteilung der Zielvariable dargestellt unter Berücksichtigung dieser Einflussvariablen.

3.2.2. Zielvariable Separationserfolg

Nach jeder Zellseparation wurde ein Blutbild des Präparats erstellt, dabei wurde neben der Erythrozyten-, Thrombozyten- und Leukozytenzahl auch die Subpopulation der Granulozyten bestimmt.

Nachfolgend findet sich eine Darstellung der Separationserfolge nach der Spendezahl im eingeschränkten Kollektiv. Im Anhang (Kap. 8.2.2) findet sich tabellarisch eine Darstellung des Separationserfolges nach relevanten Einflussvariablen gegliedert, wie sie die weitere statistische Untersuchung ergeben haben.

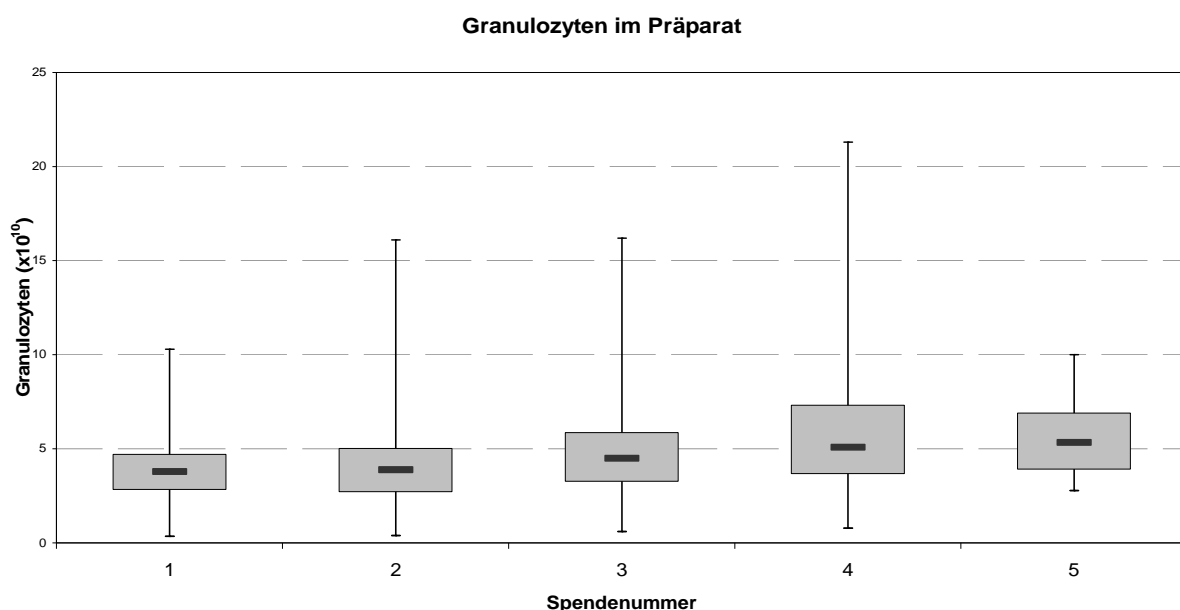


Abbildung 3 - Separationserfolg nach Spendezahl

Exemplarisch werden zudem für die erste Spende die gemessenen Parameter der hergestellten Produkte wiedergegeben, auch wenn für die Untersuchung des Separationserfolgs nur die Granulozytenzahl dient.

Blutbild vom Präparat, 1. Spende						
	n	Minimum	Quartil 1	Median	Quartil 3	Maximum
WBC ($\times 10^{10}$)	313	0,44	3,61	4,71	5,74	11,59
Granulozyten ($\times 10^{10}$)	322	0,36	2,82	3,785	4,70	10,3
Granulo-Fraktion (GRANU/WBC) (in %)	311	31,6	75,0	79,9	83,1	99,2
THR ($\times 10^9/l$)	309	83,3	311	400	488	937
RBC ($\times 10^{12}/l$)	306	0,09	0,50	1,0	1,6	42,0

Tabelle 7 - Blutbild der hergestellten Präparate aus ersten Spenden

3.2.3. Zielvariable Nebenwirkung

Nebenwirkungen wurden bei allen Spendevorgängen erfasst, auch wenn nur Nebenwirkungen des ersten Spendevorgangs auf mögliche Einflüsse hin untersucht werden können. Eine Übersicht über die aufgetretenen Nebenwirkungen in allen erfassten Spenden und Kategorien gibt nachfolgende Grafik.

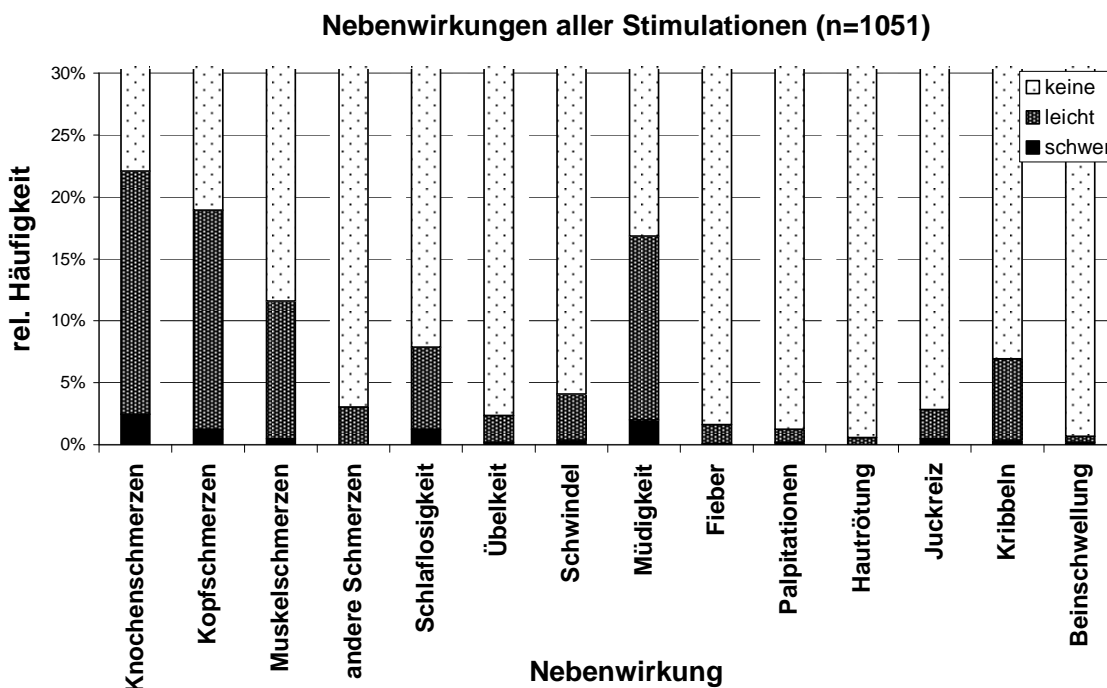


Abbildung 4 - Nebenwirkungen aller Stimulationen

Wichtige Einflussfaktoren für das Auftreten von Nebenwirkungen waren das Spendezentrum sowie Geschlecht des Spenders. Im Folgenden wird daher die Häufigkeit des Auftretens mindestens einer Nebenwirkung getrennt nach Zentrum und Geschlecht angegeben.

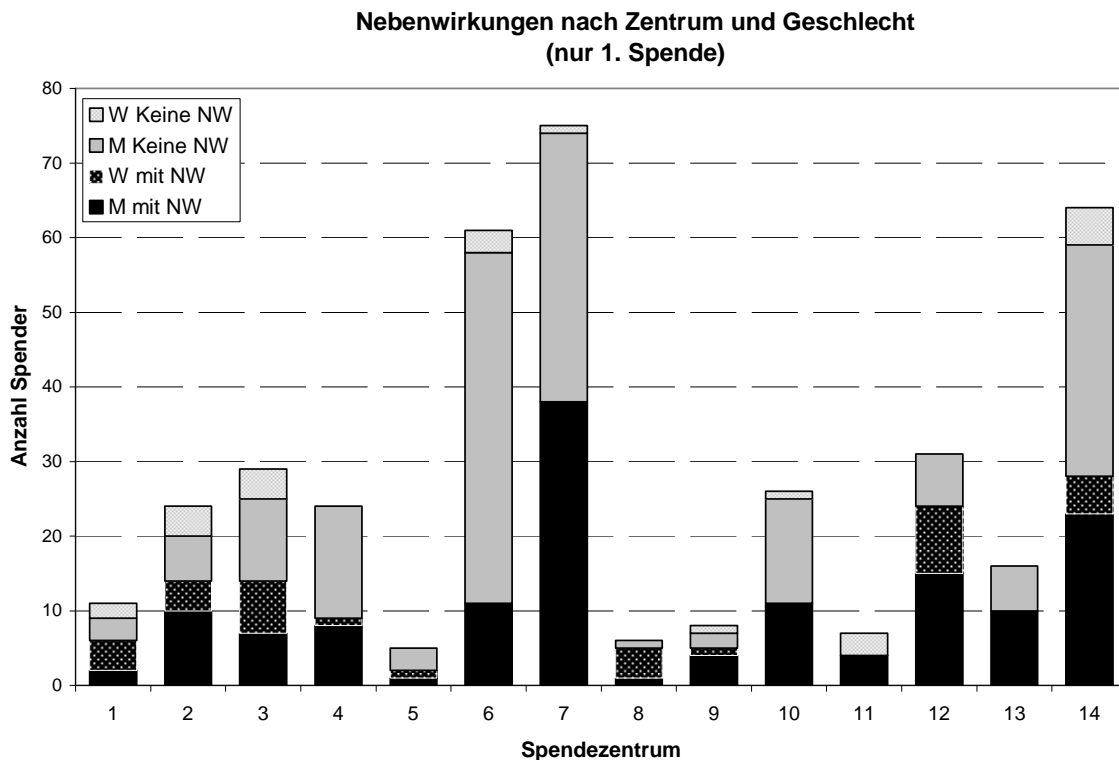


Abbildung 5 - Nebenwirkungen der 1. Spende nach Zentrum und Geschlecht

3.3. Einfaktorielle Suche nach Einflussvariablen

Im ersten Schritt wurde einfaktoriell für jeden der Einflussfaktoren im reduzierten Spenderkollektiv der Einfluss auf die Zielvariablen Stimulations- und Separationserfolg untersucht. Diese Ergebnisse beruhen jedoch auf der – ungeprüften – Vermutung, dass jeweils nur ein Einflussfaktor eine Wirkung auf die Zielvariablen Stimulations- und Separationserfolg hat. Somit müssen diese Ergebnisse noch in multifaktoriellen Verfahren auf ihre Gültigkeit geprüft werden.

3.3.1. Alter

Für das Alter der Spender, eingeteilt in vier Klassen, konnte kein Einfluss auf den Erfolg der Stimulation mit G-CSF aufgezeigt werden (Wilcoxon-Test: $p=0,3362$, Median-Test $p=0,5349$).

Der Einfluss des Alters von Spendern in vier Klasse auf den Erfolg der Separation wurde ohne klaren Hinweis auf einen Unterschied der Klassen untersucht (Wilcoxon-Test: $p=0,0566$, jedoch Median-Test $p=0,4038$). Diese deutliche Differenz der p-Werte deutet auf nicht erfüllte Voraussetzungen für die Anwendung des Wilcoxon-Tests hin, der damit ohne Aussage bleibt.

Bezüglich der in dieser Studie gewonnenen Daten kann somit kein Hinweis gefunden werden, dass das Alter einen Einfluss auf den Stimulations- bzw. Separationserfolg haben könnte.

3.3.2. Geschlecht

Es findet sich ein deutlicher Hinweis, dass der Erfolg der Stimulation vom Geschlecht des Spenders abhängen könnte (Wilcoxon- und Median-Test $p<0,0001$).

Betrachtet man die mittleren Rangsummen der Geschlechter, so hat das weibliche mit 215 einen deutlich höheren mittleren Rang inne als das männliche mit 153. Somit haben Frauen eine merklich höhere Leukozytenzahl nach der ersten Stimulation als Männer. So liegt der Median der Leukozytenzahl unmittelbar vor der Spende bei weiblichen Spendern bei $30,1 \times 10^9/l$, bei männlichen Spendern dagegen nur bei $25,4 \times 10^9/l$.

Wird der Einfluss des Geschlechts auf die Ergebnisse der Separation untersucht, so finden sich im Wilcoxon-Test $p=0,0800$ und im Median-Test $p=0,0781$. Hier lässt sich ein möglicher Zusammenhang vermuten, der jedoch nicht so deutlich ist wie der Einfluss des Geschlechts auf den Stimulationserfolg.

3.3.3. Spendezentrum

Die Auswirkungen der unterschiedlichen Spendezentren auf Zielvariablen sind bei einer multizentrischen Studie zu erwarten und so bildet auch die vorliegende keine Ausnahme. Wie bereits beschrieben wurde aus den sechs kleinsten Zentren der ein gemeinsames Zentrum gebildet und bei der Analyse ebenso wie die anderen Zentren berücksichtigt. Sowohl die Ergebnisse des Wilcoxon-Tests ($p= 0,0007$) wie auch des Median-Tests ($p=0,0016$) sprechen deutlich für einen Einfluss des Zentrums auf den Stimulationserfolg.

Auch bei der Untersuchung der Separationserfolge ergaben sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Spendezentren. Der Wilcoxon-Test und der Median-Test, beide mit $p<0,0001$, legen den deutlichen Einfluss des Spendezentrums auf die Ergebnisse der Zellseparation offen.

3.3.4. G-CSF-Typ

Untersucht wurden gemeinsam die Spenderkollektive zweier Zentren, in denen beide G-CSF-Typen zum Einsatz kamen (Zentren 12 und 14).

Dabei waren keine Auswirkungen des eingesetzten G-CSF-Typs auf den Stimulationserfolg erkennbar (Wilcoxon-Test $p=0,6912$, Median-Test $p=0,8385$).

Hinsichtlich des Separationserfolgs ergibt sich jedoch ein anderes Bild: Mit $p=0,0002$ im Wilcoxon-Test und $p=0,0005$ im Median-Test scheint der G-CSF-Typ einen deutlichen Einfluss auf die Separationsergebnisse auszuüben. Bei Spendern, die mit Filgrastim konditioniert wurden, erzielte die Separation im Mittel eine höhere Granulozytenzahl als bei Spendern, die Lenograstim erhielten.

3.4. Multifaktorielle Suche nach Einflussvariablen

Die univariate Untersuchung der Einflüsse auf die Zielvariablen Stimulations- und Separationserfolg muss unter dem Vorbehalt der wechselseitigen Beeinflussung verschiedener Faktoren betrachtet werden.

Bildeten für die univariate Suche noch die Spenden aus 13 Zentren die Datengrundlage, konnten für die multifaktorielle Suche die Spender von lediglich den Zentren 12 und 14 einbezogen werden, da nur in diesen beide G-CSF-Typen eingesetzt wurden. Die Faktoren Geschlecht, Spendezentrum und G-CSF-Typ einschließlich deren möglicher Wechselwirkungen wurden auf ihren Einfluss auf den Stimulations- bzw. Separationserfolg untersucht. Zunächst wurde die multifaktorielle Varianzanalyse eingesetzt, erzielte Ergebnisse wurden jedoch mit nichtparametrischen Verfahren kontrolliert.

3.4.1. Stimulationserfolg

In Bezug auf den Stimulationserfolg ergaben sich Hinweise für das Vorliegen einer Wechselwirkung zwischen Geschlecht und Spendezentrum ($p_{\text{Geschlecht} \times \text{Spendezentrum}}=0,0301$). Von den Voraussetzungen zur Anwendung der multifaktoriellen Varianzanalyse, nämlich Normalverteilung der Werte, kann jedoch nicht ausgegangen werden. So wurden die Ergebnisse mit nichtparametrischen Verfahren überprüft (Wilcoxon-Test $p=0,0027$, Median-Test $p=0,0013$). Es fand sich in einem Spendezentrum ein deutlicher geschlechtsabhängiger Unterschied im

Stimulationserfolg zugunsten des weiblichen Geschlechts, während sich im anderen Zentrum kein wesentlicher Unterschied zwischen den Stimulationsergebnissen der beiden Geschlechter zeigte.

Dargestellt ist der Median der Stimulationserfolge beider Geschlechter in Abhängigkeit vom Spendezentrum.

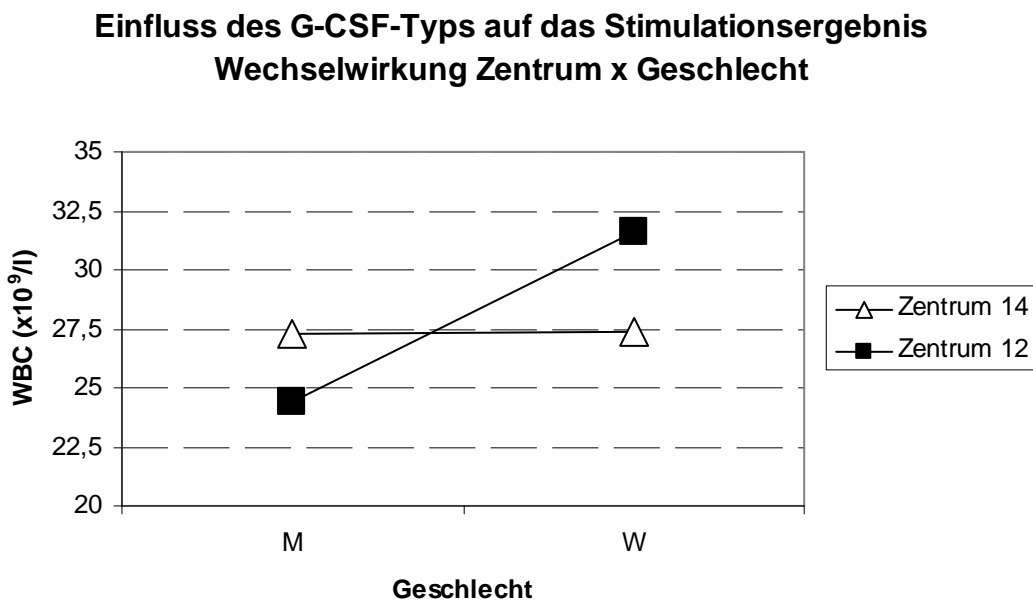


Abbildung 6 - Stimulationsergebnis: Wechselwirkung Zentrum x Geschlecht

Für den G-CSF-Typ mit den Ausprägungen Filgrastim und Lenograstim konnten keine Hinweise auf einen Einfluss auf das Stimulationsergebnis gefunden werden, $p_{G-CSF-Typ}=0,6580$. Auch findet sich kein Hinweis auf eine Wechselwirkung zwischen dem G-CSF-Typ einerseits und auf der anderen Seite dem Geschlecht ($p_{G-CSF-Typ \times Geschlecht}=0,6030$), dem Spendezentrum ($p_{G-CSF-Typ \times Spendezentrum}=0,5434$) oder beiden zusammen ($p_{G-CSF-Typ \times Geschlecht \times Spendezentrum}=0,6678$).

3.4.2. Separationserfolg

Ebenso wurde nach Einflussfaktoren wie dem G-CSF-Typ, dem Geschlecht und dem Spendezentrum auf den Separationserfolg gesucht.

Mit Hilfe der multifaktoriellen Varianzanalyse fanden sich für diese Daten Hinweise auf eine Wechselwirkung von Spendezentrum und G-CSF-Typ ($p_{G-CSF-Typ \times Spendezentrum}=0,0040$). Die nichtparametrische Überprüfung der Wechselwirkung ergab bestätigend $p<0,0001$ für den Wilcoxon-Test und $p=0,0005$ für den Median-Test. So

fürte in einem Zentrum eine Spende nach Gabe des G-CSF-Präparat Filgrastim zu höheren Zellausbeuten als Spenden, vor denen mit Lenograstim konditioniert wurde. Dieser Unterschied lässt sich jedoch im anderen Spendezentrum nicht beobachten. Das Geschlecht hatte keinen Einfluss auf den Separationserfolg ($p_{\text{Geschlecht}}=0,5412$) und es ergaben sich keine Hinweise auf Wechselwirkungen des Einflussfaktors G-CSF-Typ und dem Geschlecht ($p_{\text{G-CSF-Typ} \times \text{Geschlecht}}=0,2383$), dem Geschlecht und dem Spendezentrum ($p_{\text{Geschlecht} \times \text{Spendezentrum}}=0,3831$) oder einer dreifachen Wechselwirkung ($p_{\text{G-CSF-Typ} \times \text{Geschlecht} \times \text{Spendezentrum}}=0,7788$). Dargestellt wird der Median der Separationserfolge für beide G-CSF-Typen in Abhängigkeit vom Spendezentrum.

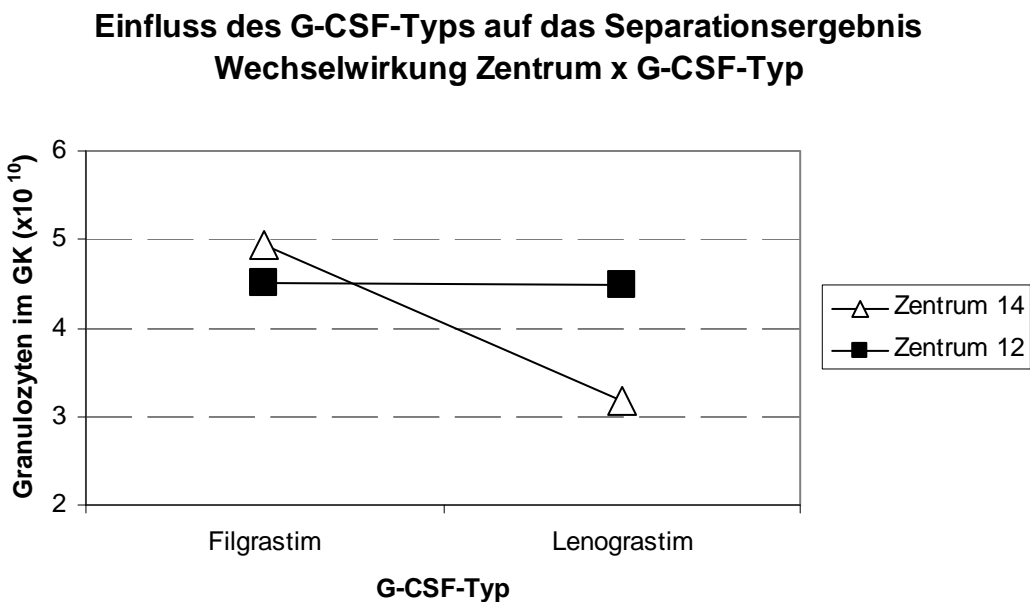


Abbildung 7 - Separationsergebnis: Wechselwirkung Zentrum x G-CSF-Typ

3.5. Zusammenhang von Stimulations- und Separationserfolg

Die Fragestellung nach einem Zusammenhang zwischen den Erfolgen von Stimulation einerseits und Separation andererseits kann wegen bekannten Zentrumseffekten nur innerhalb einzelner, möglichst großer Spendezentren nachgegangen werden. In der Spearman-Rangvarianzanalyse ergab sich für die vier untersuchten Zentren ein klarer Zusammenhang zwischen einem hohen Stimulationsergebnis und dem Erfolg einer folgenden Separation.

Zentrum	G-CSF-Präparat	p-Wert	Anzahl Spender
Zentrum 7	Lenograstim	p<0,0001	49
Zentrum 14	Lenograstim	p=0,0350	39
Zentrum 6	Filgrastim	p<0,0001	60
Zentrum 10	Filgrastim	p=0,0018	23

Tabelle 8 - Zusammenhang Stimulation- und Separationserfolg

Alle Korrelationskoeffizienten zeigen einen gleichsinnigen, positiven Zusammenhang zwischen Stimulationserfolg und Separationserfolg.

3.6. Einfluss wiederholter Spende auf Stimulations- und Separationserfolg

Die Untersuchung des Einflusses mehrfacher Spenden auf die Zielvariablen Stimulations- und Separationserfolg geschah auf zweifache Weise. Die beiden Ansätze werden zunächst getrennt betrachtet, dann wird überprüft, ob deren Ergebnisse übereinstimmen.

3.6.1. Erster Ansatz: ein Zentrum, keine Einflussvariablen

Wie die vorangegangenen Ergebnisse gezeigt haben, beeinflussen einige Faktoren neben der zu untersuchenden Spendezahl das Ergebnis von Stimulation und Separation. Bereits beschrieben wurden das Geschlecht, das Spendezentrum und der G-CSF-Typ. Um diese Einflüsse aus dieser Untersuchung herauszuhalten, wurden nur Gruppen untersucht, in denen jeweils nur Spender desselben Geschlechts, Zentrums und mit einem G-CSF-Typen stimuliert worden waren. Diese wiederum mussten drei oder mehr Spenden abgegeben haben. Dabei sollten die Stichprobenumfänge in den Gruppen nicht zu klein werden.

Als Testgruppen fanden sich somit die 47 männlichen Spender des Zentrums 6, hier kam Filgrastim zum Einsatz, und die 26 männlichen Spender des Zentrums 14, die mit Lenograstim vorbereitet wurden.

Mit Hilfe der Friedman-Rang-Varianzanalyse fand sich für beide Zentren und beide Zielvariablen ein Einfluss der wiederholten Spenden. Dabei findet sich beim Stimulationserfolg in beiden Zentren eine deutliche Abhängigkeit von der Spendezahl

ebenso wie bei dem Separationserfolg, der vielen nicht erfassbaren Einflüssen unterliegt.

Zentrum	n	G-CSF-Typ	p-Wert Stimulationserfolg	p-Wert Separationserfolg
6	47	Filgrastim	p<0,0001	p<0,0001
14	26	Lenograstim	p<0,0001	p=0,0034

Tabelle 9 - Wiederholtes Spenden - 1. Ansatz

Betrachtet man die Ergebnisse der Anschlusstests, in denen nicht nur global nach Unterschieden der drei Spenden gesucht wird, sondern die die einzelnen Spenden miteinander vergleichen, so findet man eine Steigerung des Stimulationserfolgs von Spende zu Spende in beiden Zentren (p jeweils <0,01). Für den Separationserfolg zeigt das Zentrum 6 ebenfalls eine deutliche Steigerung der Granulozyten im Präparat von Spende zu Spende (p jeweils <0,0001), im Zentrum 14 konnte kein Unterschied zwischen der ersten und zweiten Spende aufgezeigt werden, die dritte war jedoch klar erfolgreicher als jede der vorhergehenden (p jeweils <0,0001).

Die genauen Ergebnisse der Anschlusstests finden sich im Anhang (Kap. 8.2.4).

3.6.2. Zweiter Ansatz: mehrere Zentren, mit Wechselwirkung

Als Ergänzung zum obigen Lösungsansatz, mit dessen Hilfe der Einfluss der Spendezahl nur innerhalb bezüglich Geschlecht, Zentrum und G-CSF-Typ homogener Gruppen untersucht wurde, wurde hier ein größeres Spenderkollektiv aus mehreren Zentren gebildet. Um die vorige, eher enge Spenderauswahl zu erweitern, wurde ein weiterer Ansatz gewählt. Es wurden zwei Gruppen gebildet, und zwar nach dem eingesetzten G-CSF-Typ, in die Spender der jeweils größten Zentren einbezogen wurden. Weibliche Spender fanden sich in zu geringer Zahl und wurden daher nicht in diese Auswertung einbezogen. Das Prozessdiagramm gibt einen Überblick über die Auswahl und Zuordnung der Spender für diese Auswertung.

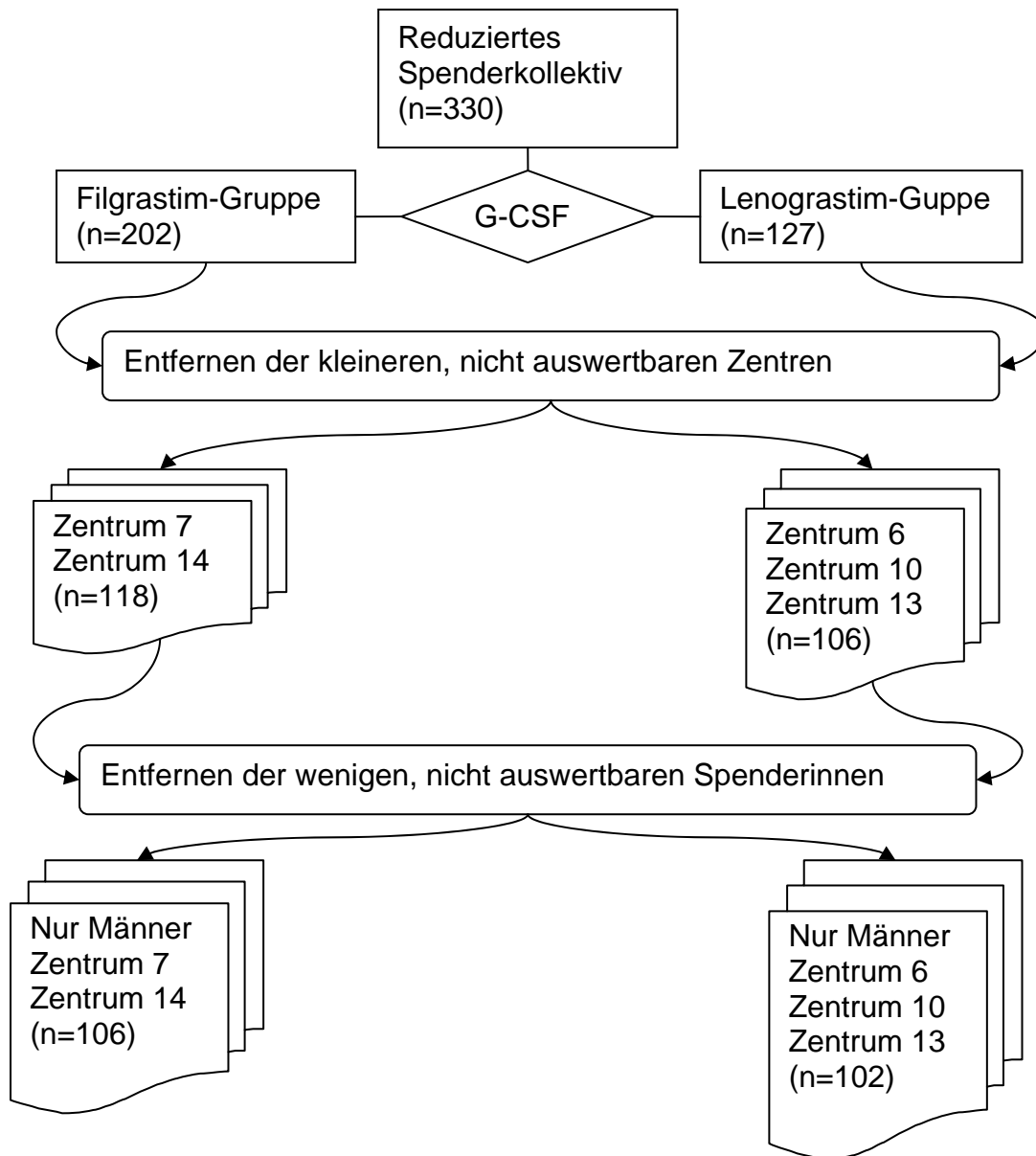


Abb. 8 - Flussdiagramm Datenauswahl zur Untersuchung der Mehrfachspende

Um die Anzahl der Einflussfaktoren und deren Wechselwirkungen im Modell einzuschränken wurde hierbei lediglich die erste mit der dritten Spende verglichen, indem die Differenzen der Zielvariablen gebildet wurden. Da nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte, kamen nicht-parametrische Verfahren zum Einsatz. Dabei wurde der Vorzeichen-Test für die Untersuchung des Effektes der Spende, unabhängig vom Zentrum, eingesetzt, nach Wechselwirkungen zwischen Spendezahl und Zentrum wurde mit dem Median-Test gesucht.

Ein positiver Effekt der wiederholten Spende auf den Stimulationserfolg findet sich in allen Zentren und bei beiden G-CSF-Typen ($p < 0,0001$). Wechselwirkungen mit dem

Spendezentrum sind durchaus zu erwarten, wie vorherige Auswertungen gezeigt haben. Dies würde bedeuten, dass sich das Ausmaß dieses Effektes in den einzelnen Spendezentren unterscheidet. In der Lenograstim-Gruppe findet sich diese Wechselwirkung auch ($p=0,0011$), in der Filgrastim-Gruppe, in der Spenden aus drei Zentren ausgewertet wurden, kann ein Effekt des Zentrums nicht gezeigt werden ($p=0,6044$).

Die Grafik zeigt exemplarisch die Boxplots der ersten und dritten Spende aus der Filgrastim-Gruppe. Dazwischen abgebildet ist ein Graph der Differenzen von dritter und erster Spende aller einbezogenen Spender. Eine Auftrennung nach Zentren wurde nicht vorgenommen, da in dieser Gruppe kein Effekt des Spendezentrums gezeigt wurde.

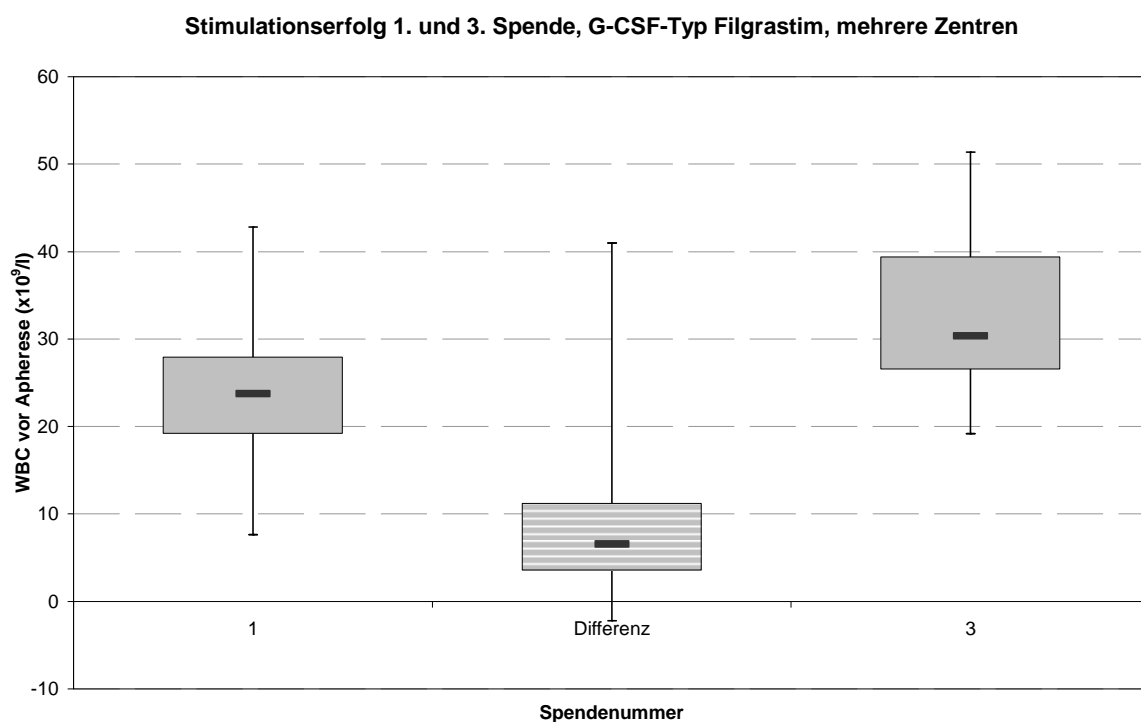


Abbildung 9 - Mehrfachspende und Stimulationserfolg

Auch auf den Separationserfolg übt eine wiederholte Spende einen positiven Einfluss aus ($p<0,0001$ in der Filgrastim-Gruppe und $p=0,0541$ in der Lenograstim-Gruppe). Wie beim Stimulationserfolg muss auch hier prinzipiell von einer Wechselwirkung mit dem Spendezentrum ausgegangen werden. Mit $p=0,0855$ in der Lenograstim-Gruppe bzw. sogar $p=0,2021$ in der Filgrastim-Gruppe kann dieser bereits bekannte Effekt aber hier nicht so deutlich wie in der univariaten und multifaktoriellen Auswertung gezeigt werden.

Gezeigt wird ein Boxplot des Separationserfolgs der ersten und dritten Spende aus der Filgrastim-Gruppe mit den gebildeten Differenzen.

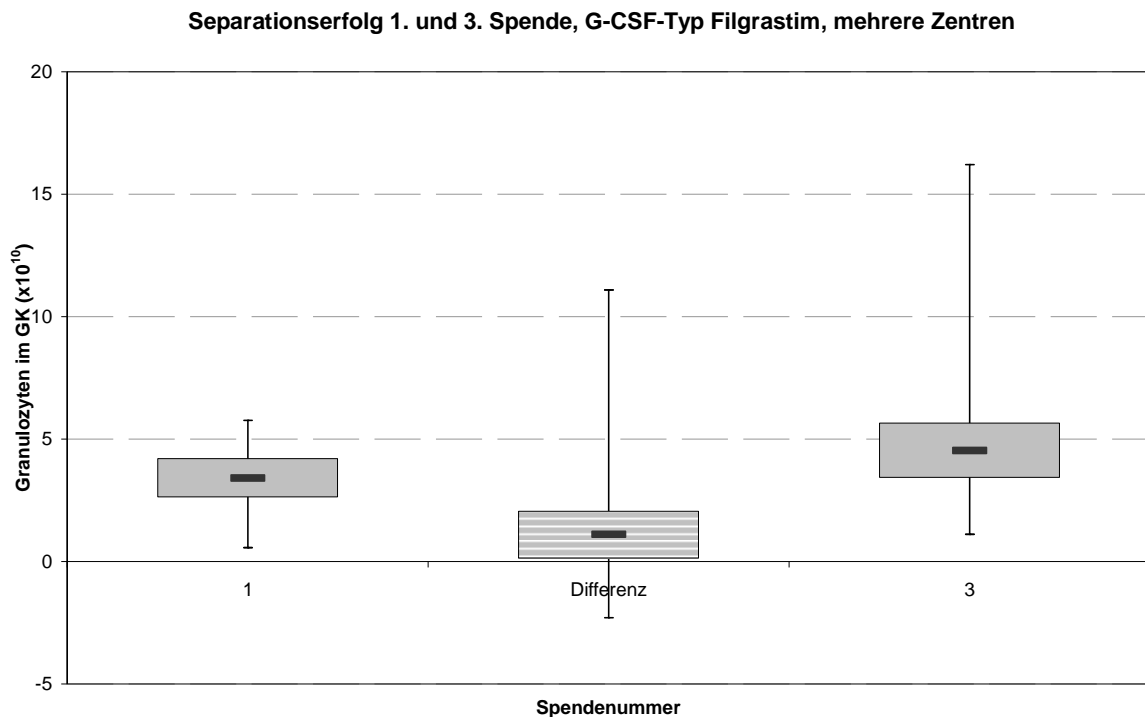


Abbildung 10 - Mehrfachspende und Separationserfolg

Insgesamt decken sich die Ergebnisse der beiden gewählten Ansätze zur Frage des Einflusses wiederholter Spenden und zeigen einen positiven Einfluss von Spenden in Aphereseserien sowohl auf das Ergebnis der Stimulation als auch auf den Separationserfolg.

3.7. Nebenwirkungen

3.7.1. Einflüsse auf das Auftreten von Nebenwirkungen

Das Auftreten von Nebenwirkungen wurde auf die Einflüsse von Alter, Geschlecht, Spendezentrum sowie der verabreichten G-CSF-Dosis und dem resultierenden Stimulationserfolg geprüft. Für diese bivariaten Untersuchungen wurden alle in die Studie eingeschlossenen Spender herangezogen.

Das Geschlecht des Spenders hat auf das Auftreten einer Nebenwirkung einen Einfluss (exakter Test nach Fisher: $p=0,0342$). Die relativen Häufigkeiten des

Auftretens von Nebenwirkungen in den Geschlechtsklassen zeigt, dass Frauen mit 60,0% deutlich häufiger als Männer mit 44,3% Nebenwirkungen angaben.

Hinsichtlich des Einflusses des Spendezeitpunkts finden sich auch hier deutliche Effekte (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,0001$).

Der Einfluss des Spenderalters auf das Auftreten von Nebenwirkungen wurde untersucht, indem die vier bereits definierten Altersklassen untersucht wurden. Es finden sich hier Hinweise auf eine unterschiedliche Häufigkeit von Nebenwirkungen in den Altersklassen (exakter Test nach Fisher: $p = 0,0627$). So haben 53,4% bzw. 50,4% der Spender in der Alterklasse der unter 30-Jährigen bzw. der 30 bis 39-Jährigen Nebenwirkungen beklagt, jedoch nur 36,9% der Spender in der Klasse der 40 bis 49-Jährigen bzw. 42,4% in der Alterklasse der über 50-Jährigen.

Weiterhin ist denkbar, dass die G-CSF-Dosis, die dem Spender zur Konditionierung verabreicht wurde, auch einen Einfluss auf das Auftreten von Nebenwirkungen hat. Dazu wurden nach der Gewichts-dosis drei Klassen gebildet und auf Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens von Nebenwirkungen gesucht. Der exakte Test nach Fisher ($p = 0,8182$) lieferte keinen Hinweis für einen Einfluss der applizierten G-CSF-Dosis.

Ein Zusammenhang der aufgetretenen Nebenwirkungen mit dem Stimulationserfolg in nach den Quartilen gebildeten Klassen wurde ebenfalls untersucht. Ein Ergebnis von $p = 0,1564$ im exakten Test nach Fisher spricht nicht für einen Zusammenhang des Auftretens mindestens einer Nebenwirkung und dem Erfolg der Stimulation. Somit kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Nebenwirkungen unmittelbar mit der Zahl der zirkulierenden Granulozyten zusammenhängen.

3.7.2. Nebenwirkungen und wiederholtes Spenden

Die Frage nach dem Einfluss wiederholter Spenden auf das Auftreten von Nebenwirkungen wurde anhand der Spenderangaben zu Nebenwirkungen anlässlich der ersten und dritten Spende untersucht. Hierbei wurde speziell die Frage untersucht, ob sich Nebenwirkungen häufiger bei der ersten oder dritten Spende einstellen. Der McNemar-Test gibt mit $p = 0,1396$ keinen Hinweis auf ein häufigeres Auftreten von Nebenwirkungen zu Beginn oder zum Ende eines Spendezyklus hin.

Die Tabelle zeigt die zugehörige Vierfeldertafel. Fettgedruckt sind die Felder der Gruppen, in denen Nebenwirkungen nur in der ersten bzw. dritten Spende aufgetreten sind.

		Dritte Spende		Summe
		Keine NW	NW	
Erste Spende	Keine NW	83	39	122
	NW	27	62	89
Summe		110	101	211

Tabelle 10 - Wiederholtes Spenden und Nebenwirkungen

3.8. Sicherheit und Komplikationen

Im Verlauf der Studie wurden insgesamt 1115 Spendevorgänge dokumentiert. Komplikationen und Spendeabbrüche wurden dokumentiert. Es wurden 13 Spendevorgänge abgebrochen, davon fünf aus Gründen, die nicht im Bereich des Spenders lagen, beispielsweise bei klinischer Besserung oder verstorbenem Patienten. In drei Fällen kam es zu einer Hämatombildung, die zum vorzeitigen Spendeabbruch führte, in zwei Fällen konnte die Spende aufgrund eines Set- oder Gerätedefekts nicht durchgeführt werden. In drei Fällen wurde zur Sicherheit des Spenders von einer Spende abgesehen (zu niedriger Ausgangs-Hb-Wert und Spender mit akutem Infekt), in einem Fall kam es zu Herzrhythmusstörungen, so dass die Spende abgebrochen werden musste.

In zusätzlichen sechs Fällen traten leichte und beherrschbare Komplikationen auf, so z.B. Kribbeln oder Wärmegefühl beim Spender, die Spende konnte jedoch durchgeführt werden.

Komplikationen	Anzahl
Abbruch aus Empfängergründen	5
Abbruch wegen Hämatombildung	3
Geräte- oder Setdefekt	2
Abbruch zur Sicherheit des Spenders	3
Leichte, beherrschbare Komplikationen (Spende durchgeführt)	6

Tabelle 11 - Komplikationen und Spendeabbrüche

Somit konnte aus Gründen, die im Bereich der Spende liegen, in acht von 1110 Spenden kein Präparat hergestellt werden, was eine Ausfallquote der Granulozytapherese von 0,72% bedeutet.

3.9. Nachuntersuchungen

Die nach zwei bis vier Wochen durchgeführte Nachuntersuchung wurde von 291 von 415 Spendern wahrgenommen. Auffälligkeiten fanden sich bei 36 von ihnen (13%). Auffällige Befunde wurden in die Kategorien Veränderungen des weißen Blutbilds, Veränderungen bei anderen Laborwerten, Auftreten von Juckreiz, sonstige klinische Beschwerden sowie Anderes unterteilt. Nachstehend findet sich eine Übersicht über die auffälligen Befunde der ersten Nachuntersuchung in den fünf Kategorien.

Kategorie	1. Nachuntersuchung (n=291)	2. Nachuntersuchung (n=171)
Veränderungen des weißen Blutbilds	11	2
Veränderungen bei anderen Laborwerten	8	12
Auftreten von Juckreiz	5	3
sonstige klinische Beschwerden	8	5
Anderes	4	2
Summe	36	24

Tabelle 12 - pathologische Befunde der Nachuntersuchungen

Mit 12 Mitgliedern ist die Kategorie der Veränderungen des weißen Blutbilds die bedeutendste. In ihr fanden sich vier Fälle von Leukopenie (unter 3000 / μ l), drei von Neutropenie (unter 1500/ μ l), vier Monozytosen (über 10% in der Differenzierung) sowie zwei Fälle von relativer Eosinophilie (über 5% in der Differenzierung). Ein Patient mit einer relativen Eosinophilie und einer Monozytose wurde doppelt aufgezählt. In der Kategorie anderer Laborwertveränderungen finden sich unter anderem sechs Fälle von Anämie (Hb unter 12,5 g/dl). Über Juckreiz klagten vier Spender, diese Nebenwirkung könnte durch das als Sedimentationsbeschleuniger zugesetzte HAES hervorgerufen worden sein. Eine genaue Übersicht über die pathologischen Befunde der Nachuntersuchung findet sich im Anhang (Kap. 8.2.3).

Die zweite Nachuntersuchung fand zwei Jahre nach der letzten Granulozytapherese statt. An ihr nahmen 171 Spender teil, 53 gaben an, für sie nicht zur Verfügung zu stehen. Von den 171 Untersuchungen fielen bei 24 Spendern (14,0%) pathologische Befunde auf. Dargestellt sind die Auffälligkeiten bei der zweiten Nachuntersuchung in

den fünf bereits benannten Kategorien. Die genaue Auflistung der Befunde findet sich im Anhang (Kap 8.2.3).

So war in zwei Fällen das Differenzialblutbild auffällig, und zwar mit einer Leukopenie und einer Monozytose. Diese Spender waren in der ersten Nachuntersuchung beide in Labor und körperlicher Untersuchung unauffällig. In der Kategorie der anderen Laborwertauffälligkeiten finden sich keine besonderen Häufungen, es sind leichte Erhöhungen der Leber- und Retentionswerte, leichte Elektrolytschwankungen und Abweichungen bei der Gerinnung zu nennen. Über länger anhaltenden Juckreiz klagten drei Spender, von denen nur einer zum Zeitpunkt der zweiten Nachuntersuchung noch über gelegentlichen Juckreiz berichtete.

Da es sich beim Juckreiz um eine besonders unangenehme Nebenwirkung handelt, findet sich in der untenstehenden Tabelle eine Übersicht aller Spender, die über Juckreiz berichteten. Wie Tabelle 13 zeigt, konnte bei keinem der Spender anhaltender Juckreiz bei beiden Nachuntersuchungen gefunden werden.

Spender-Nr.	Juckreiz –Anamnese	
	nach 2 – 4 Wochen	nach 2 Jahren
33	Juckreiz, Pickel	Nicht nachuntersucht
140	1 Woche Juckreiz	nein
146	nein	ca. 6 Monate Juckreiz
259	nein	ca. 3 Monate Juckreiz
260	Generalisierter Juckreiz	nein
279	nein	Rezidivierend Juckreiz am Rücken, ca. alle 3 Wochen
375	Intermittierend Juckreiz Rücken	Nicht nachuntersucht
388	1 Woche Juckreiz	Nicht nachuntersucht

Tabelle 13 - Auftreten der Nebenwirkung Juckreiz

4. Diskussion

4.1. Spenderkollektive

Die Demographie der Spenderkollektive zeigt über alle Zentren eine deutliche Überzahl an männlichen gegenüber weiblichen Spendern. Zunächst ist dieses Ungleichgewicht für die statistische Untersuchung der Daten zum Nachteil, da die Gruppe der Frauen für einige Fragestellungen zu klein war, um sie sinnvoll auszuwerten. Dies trat beispielsweise bei der Suche nach dem Zusammenhang zwischen Stimulationserfolg und Separationserfolg oder dem Einfluss wiederholter Spenden auf und führte zu einem Ausschluss der wenigen verbliebenen weiblichen Spender aus den Daten. Gravierender als der Ausschluss von wenigen Spendern wiegt jedoch, dass keine Aussagen über das weibliche Geschlecht zu diesen Fragestellungen gemacht werden können. Gerade die noch zu erörternde Frage, ob Frauen durch ihre höhere Leukozytenzahl nach der Stimulationsbehandlung mit G-CSF die „besseren“ Spender als Männer sind, wird durch die geringe Anzahl von Frauen im Spenderkollektiv schwerer zu beantworten.

Der Umstand, dass die Mehrzahl der nicht mit dem Empfänger verwandten Granulozytenspender aus dem Pool der auch überwiegend männlichen Thrombozytenspender stammt, könnte die geringe Anzahl von Frauen bei der Granulozytenspende erklären. Zudem gehen dem Granulozytenspender bei der Zellseparation auch Erythrozyten verloren, und gerade für Frauen, die physiologisch einen niedrigeren Hämoglobinwert aufweisen, kann dies bei einer Aphereseserie zu einer Spendeuntauglichkeit durch eine Anämie führen. Dies trat auch im Rahmen der Studie bei einer von insgesamt 56 Spenderinnen auf.

Ein weiterer Grund dafür, dass nicht mehr Frauen zur Granulozytenspende rekrutiert werden, könnte das erhöhte Auftreten von Nebenwirkungen darstellen. So klagten 60,0% der Frauen jedoch nur 44,3% der Männer nach der ersten Spende über Nebenwirkungen.

Eine Bereitschaft für die Spende trotz der erwarteten und erlebten Nebenwirkungen besteht dabei durchaus bei fast allen Spendern. Indiz hierfür sind die häufigen Aphereseserien, wobei von den 415 teilnehmenden Spendern 323 Spender mehr als eine Spende abgaben, 130 Spender sogar vier oder fünf Male spendeten. Die große

Mehrheit der Spender gab überdies an, zu weiteren Granulozytenspenden nach Stimulation mit G-CSF zur Verfügung zu stehen (98,7%).

Hinsichtlich der Altersstruktur der Spender lässt sich sagen, dass die Alterklassen der Unter-30-Jährigen, der 30-39-Jährigen und der 40-49-Jährigen in etwa gleich stark besetzt sind, jedoch ältere Spender, 50 Jahre und älter, nur auf etwa ein Drittel der anderen Klassen kommen.

Bei der Rekrutierung der Spender könnte durchaus auch vermehrt auf die Gruppen der Frauen und Älterer Spender zurückgegriffen werden, gibt es doch keine Hinweise auf vermehrte Risiken oder schlechtere Ergebnisse.

4.2. Stimulationserfolg

Bereits angesprochen wurde der Einfluss des Geschlechts auf den Stimulationserfolg. Beim weiblichen stellten sich höhere Leukozytenzahlen nach Konditionierung mit G-CSF ein ($p < 0,0001$), wie die univariate Untersuchung zeigte. In der multifaktoriellen Auswertung muss dieses klare Ergebnis ein wenig eingeschränkt werden. Hier zeigte sich eine Wechselwirkung des Geschlechts mit dem Spendezentrum. Es lässt sich jedoch über alle Spender durchaus ein positiver Effekt des weiblichen Geschlechts erkennen, in den beiden multifaktoriell untersuchten Zentren ist dieser Effekt allerdings unterschiedlich stark ausgeprägt. Ist der Stimulationserfolg im Zentrum 12 bei Frauen deutlich höher als bei Männern, zeigt sich im Zentrum 14 allenfalls ein geringer – und möglicherweise statistisch zufälliger – Vorsprung der Frauen vor den Männern bei der Leukozytenzahl nach G-CSF-Gabe. Eindeutig feststellen lässt sich jedoch, dass Frauen kein schlechteres Stimulationsergebnis aufweisen als Männer. Daher wäre eine vermehrte Rekrutierung von Frauen zur Granulozytenspende sicherlich nicht zum Nachteil. Einerseits könnte die hier aufgekommene Vermutung durch eine größere Datenbasis gestärkt werden, andererseits sind die hergestellten Präparate nicht von schlechterer Qualität, es muss eher das umgekehrte vermutet werden, nämlich dass weibliche Spender eine höhere Granulozytenernte erwarten lassen.

Ein Blick auf die verabreichte G-CSF-Dosis zeigt, dass gewichtsadaptierte Dosen von 3,3 – 6,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG zuverlässig Leukozytenzahlen von 21 – 30 $\times 10^9$ WBC/l (angegeben erstes und drittes Quartil) bewirken. Dabei ist im Korridor der eingesetzten G-CSF-Dosis kein Unterschied zwischen höheren oder niedrigeren Dosierungen nachweisbar. Ziel dieser Studie war jedoch nicht die Untersuchung

verschiedener Stimulationsprotokolle, daher können nur begrenzt Aussagen diesbezüglich getroffen werden. Die Praxis der Stimulation von Spendern geht in den einzelnen Zentren immer noch auseinander, beispielsweise was den Einsatz von Kortikosteroiden anbetrifft. Ihr Einsatz konnte im Rahmen dieser Studie leider nicht betrachtet werden, da sie zu selten eingesetzt wurden, möglicherweise aufgrund des Verdachts, sie könnten im Zusammenhang mit der Entwicklung von Katarakten stehen.

Auch zwischen den Präparaten Filgrastim und Lenograstim konnte kein Unterschied gezeigt werden. Beide Präparate erscheinen gleich gut zur Spenderkonditionierung geeignet, ebenso besteht preislich und bezüglich der Verfügbarkeit kein nennenswerter Unterschied.

Ein wichtiger Einflussfaktor auf das Stimulationsergebnis ist das Spendezentrum. Unterschiede in den Stimulationserfolgen der verschiedenen Zentren sind durchaus im Rahmen einer multizentrischen Studie zu erwarten. Dennoch stellt sich die Frage, ob vielleicht die kleineren Zentren gegenüber den größeren schlechter abschneiden. Betrachtet man die Rangsummen im Wilcoxon-Test, so findet man große Zentren mit niedrigen mittleren Rangsummen, so z.B. das zweitgrößte Zentrum mit 135, das aus den sechs kleinsten Zentren gebildete „Überzentrum“ jedoch mit einer mittleren Rangsumme von 203,8. Es kann bezüglich des Stimulationserfolgs also nicht auf eine Art Erfahrung oder Lernkurve geschlossen werden, die unmittelbar die Ergebnisse eines Zentrums verbessert. Vielmehr müssen andere, unbekannte Ursachen für die Zentrumseffekte angenommen werden.

Wie die Untersuchungen zeigen, stellen wiederholte Spenden, etwa im Rahmen einer Aphereseserie, einen durchaus positiven Einfluss auf die Stimulationsergebnisse dar. Wird Spendern in kurzer Folge wiederholt G-CSF injiziert, so steigt deren Leukozytenzahl auf deutlich höhere Werte an als bei der ersten Gabe. Dieser Effekt kann und sollte durchaus genutzt werden, zumal es keinen Hinweis auf zunehmende Beschwerden oder Risiken durch den wiederholten Einsatz von G-CSF in der hier verwendeten Dosierung beim Spender gibt.

4.3. Separationserfolg

Der Erfolg einer Zellseparation unterliegt vielen Einflüssen, die nicht in dieser Studie erfasst werden können. So arbeitet verschiedenes Personal mit den Geräten und es kommen verschiedene Meßmethoden zum Einsatz.

Um trotz dieser vielfachen Einflüsse Aussagen über Faktoren zu treffen, die den Separationserfolg betreffen, soll zunächst der Zusammenhang mit dem Erfolg der Stimulationsbehandlung betrachtet werden.

Die Vermutung oder intuitive Schlussfolgerung, dass ein hohes Stimulationsergebnis automatisch auch ein gutes Separationsergebnis erwarten lässt, konnte bestätigt werden. In allen vier untersuchten Spendezentren fand sich hier ein deutlicher, positiver Zusammenhang (in drei Zentren $p < 0,0001$ und in einem $p = 0,0350$). Dieser Effekt konnte aufgrund der geringen Anzahl von Spenderinnen gerade an den großen Zentren nur bei männlichen Spendern gezeigt werden, es gibt jedoch keine sinnvolle Erklärung für geschlechtsspezifische Unterschiede an der Apheresemaschine.

Prinzipiell ist der Zusammenhang von der Leukozytenzahl vor Apherese mit der gesammelten Zellzahl lange bekannt und der Grund für jegliche medikamentöse Vorbereitung des Spenders. Interessant anzumerken ist, dass sich dieser Effekt auch innerhalb dieser Studie zeigt, in der ein weitgehend einheitliches Stimulationsprotokoll umgesetzt wurde, das sich bereits als erfolgreich in der Granulozytapherese erwiesen hat⁵². Es zeigt sich somit, dass Sorgfalt und Genauigkeit bei der Stimulation durchaus ihren Platz haben, aber auch, dass sich möglicherweise geringe Änderungen bzw. Verbesserungen am Stimulationsprotokoll durchaus in der Zellausbeute niederschlagen können.

Den wohl bedeutendsten Einfluss auf den Separationserfolg hat das Spendezentrum. Diese Tatsache verdeutlicht einerseits die bereits erwähnte Komplexität des Verfahrens, andererseits könnte insbesondere hier ein Austausch über das Vorgehen einzelner Zentren und der Einsatz von individuell angepassten Verfahren zu einer flächendeckenden Verbesserung der Qualität von Granulozytenkonzentraten führen.

Die multifaktorielle Untersuchung der Einflussvariablen auf den Separationserfolg zeigte eine Wechselwirkung von G-CSF-Typ und Spendezentrum. So fand sich im Zentrum 14 eine deutlich höhere Zellausbeute bei Spendern, denen Filgrastim gegeben wurde gegenüber den Lenograstim-Spendern. Im Zentrum 12 fand sich dagegen nur ein kaum nennenswerter Unterschied.

Interessant in diesem Zusammen erscheint ebenfalls, dass der G-CSF-Typ auf das Stimulationsergebnis keinen Einfluss hat. Da aber Stimulation und Separation zusammenhängen, erscheint dieser Effekt trotz seiner hohen Testwahrscheinlichkeit

(mit bis zu $p < 0,0001$ in der nichtparametrischen Bestätigung der Wechselwirkung von G-CSF-Typ und Spendezentrum) als wenig aufschlussreich. In der Literatur ist über eine unterschiedliche Wirkung von Filgrastim und Lenograstim auf den Separationserfolg ebenfalls bisher nicht berichtet worden. Eine Überprüfung des Effekts an mehreren Zentren könnte hier klären, doch dazu müssten diese beide G-CSF-Präparate einsetzen, was in dieser Studie leider nur zwei Zentren taten.

Unterschiedliche Separationserfolge zwischen den Zentren lassen sich sicherlich niemals völlig ebnen. Umso bedeutsamer lässt dieser Umstand andere, beeinflussbare Faktoren werden. Als bedeutendster kann hier sicherlich die Leukozytenzahl vor der Spende betrachtet werden, und Faktoren, die diesen beeinflussen, wurden oben betrachtet.

4.4. Nebenwirkungen

Das Auftreten von Nebenwirkungen der Stimulationsbehandlung bei der Granulozytenspende ist für den Spender mit einer Belastung verbunden, die über die üblichen unerwünschten Effekte einer Zellseparation hinausgehen. Gerade die Gabe des G-CSF mit seinen Nebenwirkungen und der seltene, aber unangenehme Juckreiz, der nach dem Einsatz von HAES auftreten kann müssen dem Spender erklärt und zugemutet werden können.

Spender, die häufiger über Nebenwirkungen berichteten, waren weiblichen Geschlechts. Mit 60,0% klagten Frauen deutlich häufiger als Männer mit 44,3% über Nebenwirkungen. Die Ursache für diesen Unterschied bleibt unklar. Ob dies beispielsweise auf ein gemeinhin angenommen stärker reagierendes Gefäßsystem zurückzuführen ist oder auf ein erhöhtes Körperbewusstsein, sei dahingestellt.

Die teils deutlichen Unterschiede von Nebenwirkungen in verschiedenen Spendezentren spiegeln wohl eher wider, dass trotz der standardisierten Fragebögen unterschiedlich mit diesen verfahren wird. Das im medizinischen Anamnesegespräch leider nicht unüblich suggestive Fragen kann sowohl zu positiven wie auch negativen Angaben führen.

In ihrer Studie fanden Price et al.¹⁵, dass 72% ihrer mit G-CSF und Kortikosteroiden stimulierten Spender über Nebenwirkungen berichteten. Stroncek et al.⁴⁷ berichten ebenfalls, dass 75% ihrer mit G-CSF und Kortikosteroiden behandelten Spender über mindestens eine Nebenwirkung klagten, bei den nur mit G-CSF stimulierten Spendern waren es gar 85%. Diese beiden Studien geben höhere Werte für das

Auftreten von Nebenwirkungen an als in dieser Studie gefunden (44,3% bei Männern und 60,0% bei Frauen). Die im Rahmen dieser Studie befragten Spender waren über alle bekannten Nebenwirkungen aufgeklärt und hatten in der Regel bereits eigene Erfahrungen mit der maschinellen Zellseparation gemacht, was möglicherweise eine vergleichsweise hohe Indolenz gegenüber aufgetretenen Nebenwirkungen mitbegründen könnte.

Hinsichtlich des Alters von Granulozytenspendern konnte gezeigt werden, dass ältere Spender über weniger Nebenwirkungen berichten als jüngere dies tun. Über die Hälfte aller Spender unter 40 Jahren klagten über das Auftreten mindestens einer Nebenwirkung, bei den älteren Spendern sank der Anteil auf 37% bei den 40 bis 49-Jährigen bzw. auf 42% bei den über 50-Jährigen.

Ein Faktor, der keinen Einfluss auf das Auftreten von Nebenwirkungen hatte, war die verabreichte G-CSF-Dosis. Anzumerken ist, dass hier alle Spender untersucht wurden, nicht nur Spender mit G-CSF-Dosen von 3,3 bis 6,6 µg/kg KG. Dabei lag die minimale Dosis bei 2,4 µg/kg KG, die höchste verabreichte bei 10 µg/kg KG.

Keinen Einfluss auf das Auftreten von Nebenwirkungen hatte die Ordnungszahl der Spende, d. h. es war unerheblich für das Auftreten von Nebenwirkungen, ob ein Spender zum ersten oder zum dritten Mal stimuliert wurde. Dies unterstützt zusätzlich zur verbesserten Stimulierbarkeit und zu höheren Separationsergebnissen die Durchführung mehrerer, konsekutiver Spenden in einer Aphereseserie.

4.5. Sicherheit und Zuverlässigkeit

Wichtige Bedenken und Vorbehalte der Granulozytapherese sind einerseits die Sicherheit des Stimulationsverfahrens und die Zuverlässigkeit der Herstellung von Präparaten mit gleich bleibend hoher Qualität.

Bedenken hinsichtlich der Stimulation und Spende wurden in dieser Studie adressiert und sowohl die Nebenwirkungen der Stimulation als auch die Ergebnisse der Nachuntersuchungen liegen in einem Bereich, der die Risiken beim Einsatz von G-CSF für die Gewinnung von Granulozyten zur Transfusion überschaubar und vertretbar erscheinen lässt. Die aufgetretenen Nebenwirkungen bei der Stimulation sind vorwiegend leichter Natur und vorübergehender Natur. Dass die Mehrzahl der Spender (331 von 415) sich bereit erklärte, mehr als eine Spende abzugeben, zeigt, wie die empfundene Bedeutung der Spende für den Empfänger die erlebten

Beschwerden überwog. Nach der Bereitschaft zu einer erneuten Spende und Stimulation mit G-CSF befragt, gab mit 98,7% die große Mehrheit der Spender ihr Einverständnis. Nun kann die subjektive Wahrnehmung des Spenders kein alleiniger Maßstab für die Sicherheit eines Verfahrens sein, jedoch deckt sie sich in diesem Fall mit den Ergebnissen der beiden Nachuntersuchungen, in denen keine schwerwiegenden Ereignisse dokumentiert wurden. In der ersten Nachuntersuchung nach zwei bis vier Wochen wurden zwar noch vereinzelt Beschwerden angegeben und auch in den Laboruntersuchungen fanden sich pathologische Werte, insbesondere bei der Leukozytendifferenzierung und auch beim Hämoglobin, das Spendern nach einer Aphereseserie erkennbar verloren geht. In der zweiten Nachuntersuchung nach zwei Jahren fanden sich nur noch Einzelfälle, darunter ein Fall von Leukopenie und einer von Juckreiz, die sich inhaltlich mit der Granulozytenspende in Verbindung bringen ließen.

Diese Ergebnisse decken sich weitgehend mit denen anderer Langzeitstudien zur Sicherheit von G-CSF bei kurzer Anwendung wie der Granulozyten- oder Stammzellspende. So beobachtete eine italienische Gruppe 101 mit G-CSF kurzfristig behandelte, gesunde Spender und fand nach mehr als drei Jahren keine offensichtlichen Nebenwirkungen.⁵³

Hinsichtlich der Zuverlässigkeit des Verfahrens ist nochmals der individuelle Aufwand bei jeder einzelnen Spende, die gerichtet für jeden Empfänger vorgenommen wird, zu beachten. Ein Ersatzspender kann aufgrund des Intervalls zwischen Stimulation und Spende in der Regel erst am Folgetag gefunden werden. Dieser Zeitraum kann jedoch für den Empfänger entscheidend zum Progress der Erkrankung werden. In dieser Studie konnten nur etwa 0,7% der angeforderten Produkte nicht unmittelbar bereitgestellt werden.

Die hergestellten Produkte entsprachen den Anforderungen an Granulozytenkonzentrate, so lag der Median der in ihnen enthaltenen Granulozyten bei $3,75 \times 10^{10}$ Zellen bei der ersten Spende und stieg bis auf über 5×10^{10} Zellen bei der vierten und fünften Spende einer Serie an. Auch das untere Quartil der Granulozytenzahlen lag bei allen Spenden über $2,7 \times 10^{10}$ Zellen pro Konzentrat. Dass dennoch auch Produkte mit sehr geringen Granulozytenzahlen hergestellt wurden, kann verschiedene Ursachen haben. Präparate, die für Säuglinge oder gar Neonaten hergestellt werden, sind naturgemäß kleiner und enthalten weniger

Granulozyten, ohne dass die transfundierte Granulozytenzahl pro Kilogramm Körpergewicht geringer wäre als bei Erwachsenen.

Somit kann die Sicherheit und auch die Zuverlässigkeit der präparativen Granulozytapherese durchaus positiv beurteilt werden. Die Sicherheit der Spender kann gewährleistet werden und die unangenehmen Nebenwirkungen sind in fast allen Fällen nur von kurzer Dauer. Die Zuverlässigkeit des Verfahrens konnte eindrucksvoll gezeigt werden, und zwar unabhängig von den durchaus vorhandenen Zentrumeffekten. Es wurden mit sehr geringen Ausfallquoten Präparate hergestellt, die deutlich über den geforderten 1×10^{10} Granulozyten pro Konzentrat liegen, und zwar im Mittel drei- bis fünffach darüber.

Dennoch wurde bei einem Spender Juckreiz beobachtet, der zwar nur intermittierend, aber auch noch zwei Jahre nach der letzten Apherese auftrat. Juckreiz ist bekannt als seltene Folge nach Infusion von HAES. Gerade zu den verschiedenen Sedimentationsbeschleunigern bei der Granulozytapherese hat es bisher bereits einige Untersuchungen gegeben, die jedoch eine deutliche Überlegenheit des HAES mit einem Molekulargewicht von 450 000 Da gegenüber dem leichteren 130 000 Da HAES, das deutlich seltener mit Juckreiz in Verbindung gebracht werden kann. Möglicherweise kann ein Sedimentationsbeschleuniger gefunden werden, der den sehr unangenehmen Juckreiz nicht auslöst und dennoch zu guten Ergebnissen bei der Zellseparation führt.

4.6. Abschließende Betrachtungen

In der Übersicht der Ergebnisse dieser Studie lassen sich einige Thesen formulieren.

- Die Granulozytapherese ist ein zuverlässiges Verfahren zur Herstellung von Granulozytenkonzentraten.
- Die Stimulation mit $5 \mu\text{g/kg KG}$ rekombinantem G-CSF ist ein zuverlässiges und sicheres Werkzeug zur Vorbereitung des Spenders auf die Granulozytenspende.
- Den Spender betreffende Risiken existieren und können nach dem derzeitigen Wissenstand nicht ausgeschlossen werden, sind aber gering und treten selten auf. Die Granulozytapherese ist für den Spender ein sicheres Verfahren.
- Zur Spende gebeten werden sollten vermehrt Frauen, da sie vermutlich höhere Leukozytenwerte nach Stimulation mit G-CSF produzieren.

- Wiederholtes Spenden in kurzen Abständen (Aphereseserien) ist durchaus sinnvoll, da sich für den Spender keine Nachteile daraus ergeben und sich die Zellausbeute in der Folge der Serie erhöht.
- Unterschiede bei den Ergebnissen verschiedener Zentren sind teils erheblich. Ein vermehrter Erfahrungsaustausch sowie standardisierte Prozessabläufe könnten in einigen Fällen von Vorteil sein.

5. Zusammenfassung

Granulozyten sind unabdingbar für die Aufrechterhaltung der Immunkompetenz. Im Bedarfsfall können sie einem Spender entnommen und dem Empfänger transfundiert werden. Als Standardtechnik wird eine Granulozytenstimulation mit rekombinantem Granulozytenkolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) als Vorbereitung zur Zellapherese und gerichteten Herstellung der Granulozyten-Konzentrate eingesetzt.

Diese Studie untersucht Wirkung und Nebenwirkung der Vorbehandlung von Blutspendern mit G-CSF zur präparativen Granulozytapherese. Als Stimulationsprotokoll wurden 5µg/kg Körpergewicht G-CSF verabreicht, maximal vier Stimulations- und Apheresevorgänge wurden in Serie durchgeführt.

Es wurden 1115 Stimulations- und Spendevorgänge von 415 Spendern an 14 Spendezentren untersucht auf den Erfolg der Stimulation und der Zellseparation. Zudem wurden die Spender über einen Zeitraum von zwei Jahren auf Nebenwirkungen überwacht.

Es zeigte sich, dass mit dem untersuchten Stimulationsverfahren Spender sicher zur Zellapherese vorbereitet und so zuverlässig den geltenden Qualitätsanforderungen genügende Granulozytenkonzentrate hergestellt werden können. Im untersuchten Kollektiv zeigten Frauen nach der Stimulation höhere Leukozytenwerte als Männer. Ebenso war bei Spenden in Aphereseerien in der Folge der Serie die Zellausbeute erhöht. Trotz einheitlichen Stimulations- und Aphereseprotokollen gab es deutliche Unterschiede zwischen den Stimulations- und Separationserfolgen der einzelnen Zentren.

6. Summary

Granulocytes are essential for immunocompetence. They can be donated and transfused therapeutically. The established standard technique is stimulation with recombinant granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) as donor preparation for granulocyte apheresis for on-demand preparation of granulocyte concentrates.

This study investigated effects and side effects of the preconditioning of donors with G-CSF for the preparative granulocyte apheresis. The stimulation protocol consisted of 5µg/kg body weight G-CSF and up to four consecutive cycles of stimulation and apheresis.

1115 processes of stimulation and apheresis of 415 donors in 14 donation centers were examined for the success of stimulation and cell separation. Donors were also monitored for side effects for the duration of two years.

We could show that the applied stimulation protocol is safe for donors and ensures reliable steady success to produce granulocyte concentrates that comply with current quality requirements. In the study collective females showed higher leukocyte blood counts after stimulation than male donors. Also concentrates produced in consecutive donations showed higher cell amounts as the number of donations increased. In spite of a common protocol for stimulation and separation for all centers we found considerable differences in the success of both stimulation and cell separation.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

8. Anhang

8.1. Prüfplan

8.1.1. Voruntersuchung

Studienteilnehmer: _____

Datum, Spender (Initialen, Geschlecht, Alter): _____

1. Spendereingangsuntersuchung

Der Zeitraum zwischen Apherese und Voruntersuchung darf nicht größer als 7 Tage sein.

Laborparameter	Auffällige Befunde
Blutgruppenserologie: ABO-Kompatibilität und Ery.-Antikörpersuche Leukozyten-Antikörpersuche: ja <input type="checkbox"/> ; nein <input type="checkbox"/> (Spenderin mit 2 oder mehr Schwangerschaften)	
Infektionsserologie (HBsAG, HCV-NAT, HCV-, HIV1+2-, CMV-, Lues-Antikörper)	
GPT, GOT, γ GT, LDH, Alkal. Phosphatase	
Blutbild einschließlich Differenzierung	
Kreatinin	
Urinstatus (Teststreifen für Eiweiß, Glukose, Blut)	
Gesamteiweiß	
Natrium, Kalium, Calcium	
Gerinnung (aPTT, TZ, Quick, Fbg)	
Blutzucker	
Blutprobe für G-CSF-Spiegel-Bestimmung vor G-CSF-Gabe abgenommen	ja <input type="checkbox"/> ; nein <input type="checkbox"/>
β -HCG bei fertilen Frauen	

Ärztliche Untersuchung einschließlich Anamnese:

8.1.2. Spendedokumentation

Studienteilnehmer: _____

Datum, Spender (Initialen, Geschlecht, Alter): _____

2. Granulozytenpräparation

G-CSF-Dosis: 5µg/kg KG 8 – 12 h vor Apherese, andere: _____

G-CSF-Präparat: Filgrastim / Lenograstim

G-CSF-Applikationsmodus: tägl. Gabe / Gabe an jedem zweiten Tag , anderer: _____

Spender: verwandt <input type="checkbox"/> ; unverwandt <input type="checkbox"/> HLA-ausgewählt <input type="checkbox"/>	Granulozytapherese			
	1	2	3	4
Erythrozytenzahl vor Apherese				
Hb (> 11,5 g/l)				
Thrombozytenzahl (>100.000/µl)				
Leukozytenzahl (<70.000/µl)				
Leukozyten-Kreuzprobe	neg. <input type="checkbox"/>	neg. <input type="checkbox"/>	neg. <input type="checkbox"/>	neg. <input type="checkbox"/>
LCT <input type="checkbox"/> , GIFT <input type="checkbox"/> , GAT <input type="checkbox"/> , _____ <input type="checkbox"/>	pos. <input type="checkbox"/>	pos. <input type="checkbox"/>	pos. <input type="checkbox"/>	pos. <input type="checkbox"/>
Zellseparatortyp				
Apheresedauer				
Prozeßvolumen				
HAES-Art, HAES-Verbrauch <input type="checkbox"/> HAES 450.000m <input type="checkbox"/> HAES 200.000				
ACD-Verbrauch				
Präparatevolumen				
Leukozytengehalt				
Granulozytengehalt (x 10 ¹⁰)				
Thrombozyten- und Erythrozytengehalt				
Blutprobe für G-CSF-Spiegel-Bestimmung nach G-CSF-Gabe abgenommen	ja <input type="checkbox"/> ; nein <input type="checkbox"/>	ja <input type="checkbox"/> ; nein <input type="checkbox"/>	ja <input type="checkbox"/> ; nein <input type="checkbox"/>	ja <input type="checkbox"/> ; nein <input type="checkbox"/>
Auffälligkeiten / Komplikationen während der Apherese	keine <input type="checkbox"/>	keine <input type="checkbox"/>	keine <input type="checkbox"/>	keine <input type="checkbox"/>

8.1.3. Nebenwirkungen

Studienteilnehmer: _____

Datum, Spender (Initialen, Geschlecht, Alter): _____

Fragebogen über Nebenwirkungen nach G-CSF-Gabe (bitte nach jeder Apherese ausfüllen)

Spende	1. <input type="checkbox"/>			2. <input type="checkbox"/>			3. <input type="checkbox"/>			4. <input type="checkbox"/>		
Datum:												
Dosis, wenn nicht 5 µg/kg KG												
<u>Nebenwirkungen:</u>	keine	leicht	stark	keine	leicht	stark	keine	leicht	stark	keine	leicht	stark
Knochenschmerzen												
Kopfschmerzen												
Muskelschmerzen												
Andere Schmerzen												
Schlaflosigkeit												
Übelkeit												
Schwindelgefühl												
Müdigkeit												
Fieber, Schüttelfrost												
unregelmäßiger Herzschlag												
Hautrötung												
Juckreiz												
Kribbeln i. d. Fingern, Lippen												
Beinschwellungen												
Sonstige Nebenwirkungen, bitte beschreiben, ggf. Rückseite benutzen												

Ich würde mir G-CSF wieder verabreichen lassen

ja / nein

Ich würde Granulozyten nochmals spenden

ja / nein

Herzlichen Dank!

8.1.4. Nachuntersuchung

Studienteilnehmer: _____

Datum, Spender (Initialen, Geschlecht, Alter): _____

Spendernachuntersuchung

Untersuchung 2 – 4 Wochen nach Granulozytapherese

Untersuchung 2 Jahre nach Granulozytapherese

Laborparameter	Auffällige Befunde
GPT (Meßtemp. Angeben), GOT, γGT, Alkal. Phosphatase, LDH	
Blutbild einschließlich Differenzierung	
Kreatinin	
Urinstatus (Teststreifen für Eiweiß, Glukose, Blut)	
Gesamteiweiß	
Natrium, Kalium, Calcium	
Gerinnung (aPTT, TZ, Quick, Fbg)	
Blutzucker	
Infektionsmarker (HBV, HCV, HIV)	
Nur Untersuchung nach 2-4 Wochen: Blut für G-CSF-Spiegel-Kontrolle abgenommen	ja <input type="checkbox"/> ; nein <input type="checkbox"/>

Ärztliche Untersuchung einschließlich Anamnese: (wichtig: vom Spender geäußerte Nebenwirkungen wie Kopf- oder Knochenschmerzen, Schlaflosigkeit etc.)

8.2. Datentabellen

8.2.1. Zielvariable Stimulationserfolg

WBC vor Apherese
getrennt nach Zentrum, G-CSF-Typ und Geschlecht

Spende	Zentrum	G-CSF-Typ	Geschlecht	n	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
1	1	F	M	4	20.400	23.550	26.700	28.050	29.400
1	1	F	W	6	21.800	23.500	28.350	29.700	34.900
1	2	F	M	1	31.400	31.400	31.400	31.400	31.400
1	2	F	W	2	28.200	28.200	29.850	31.500	31.500
1	2	L	M	1	30.400	30.400	30.400	30.400	30.400
1	3	F	M	18	16.700	21.200	25.200	31.100	43.400
1	3	F	W	12	19.800	23.200	30.100	33.800	44.700
1	5	F	M	8	17.700	24.250	30.350	32.300	41.800
1	5	F	W	1	28.100	28.100	28.100	28.100	28.100
1	6	F	M	60	11.800	19.450	23.550	28.200	39.700
1	6	F	W	3	24.000	24.000	25.900	40.400	40.400
1	7	L	M	53	10.400	19.300	22.000	28.600	36.600
1	7	L	W	1	27.500	27.500	27.500	27.500	27.500
1	8	L	M	2	22.500	22.500	29.350	36.200	36.200
1	8	L	W	3	30.100	30.100	31.600	34.400	34.400
1	9	F	M	4	19.500	22.950	28.050	29.750	29.800
1	9	F	W	2	21.500	21.500	23.150	24.800	24.800
1	10		M	1	24.200	24.200	24.200	24.200	24.200
1	10	F	M	23	7.630	19.000	24.500	29.000	42.810
1	10	F	W	1	31.000	31.000	31.000	31.000	31.000
1	11	F	M	1	19.900	19.900	19.900	19.900	19.900
1	12	F	M	12	15.600	23.900	25.550	28.250	32.600
1	12	F	W	8	20.200	29.500	31.400	37.800	41.200
1	12	L	M	14	13.400	19.500	22.650	27.800	37.700
1	12	L	W	6	27.400	27.400	30.600	33.000	35.200

Spende	Zentrum	GCSF-Typ	Geschlecht	n	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
1	13	F	M	16	19.000	23.050	27.200	32.550	40.900
1	14	F	M	14	16.000	23.600	27.650	29.500	31.500
1	14	F	W	3	22.500	22.500	29.900	32.300	32.300
1	14	L	M	39	16.000	24.000	27.400	30.100	49.300
1	14	L	W	8	18.100	23.600	26.350	31.050	36.700
2	1	F	M	4	26.300	27.600	29.950	33.750	36.500
2	1	F	W	4	14.200	21.100	31.050	37.550	41.000
2	2	F	M	1	34.500	34.500	34.500	34.500	34.500
2	2	F	W	1	42.200	42.200	42.200	42.200	42.200
2	2	L	M	0
2	3	F	M	12	21.100	23.250	31.350	36.150	41.500
2	3	F	W	8	19.100	31.150	33.600	35.600	39.100
2	5	F	M	8	14.400	26.050	35.250	37.450	47.400
2	5	F	W	1	35.100	35.100	35.100	35.100	35.100
2	6	F	M	53	7.940	21.100	25.900	31.500	41.200
2	6	F	W	3	25.800	25.800	33.200	39.400	39.400
2	7	L	M	42	13.100	20.200	22.650	27.000	35.700
2	7	L	W	1	20.700	20.700	20.700	20.700	20.700
2	8	L	M	1	26.200	26.200	26.200	26.200	26.200
2	8	L	W	2	40.200	40.200	41.000	41.800	41.800
2	9	F	M	4	23.400	26.600	30.400	32.250	33.500
2	9	F	W	1	25.200	25.200	25.200	25.200	25.200
2	10		M	1	32.000	32.000	32.000	32.000	32.000
2	10	F	M	18	19.300	22.700	30.600	35.800	42.210
2	10	F	W	1	36.000	36.000	36.000	36.000	36.000
2	11	F	M	0
2	12	F	M	10	19.700	23.500	26.350	27.800	30.900
2	12	F	W	4	16.900	25.200	33.500	35.550	37.600
2	12	L	M	8	16.200	21.300	23.300	28.250	33.700
2	12	L	W	6	27.300	28.400	29.650	32.300	41.900

Spende	Zentrum	GCSF-Typ	Geschlecht	n	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
2	13	F	M	12	19.900	23.050	27.650	32.200	42.200
2	14	F	M	12	15.600	23.450	28.000	31.600	35.200
2	14	F	W	3	19.600	19.600	31.900	40.400	40.400
2	14	L	M	37	19.000	25.800	28.300	33.800	47.800
2	14	L	W	7	19.700	22.000	30.700	36.900	45.200
3	1	F	M	4	16.800	24.150	33.250	39.250	43.500
3	1	F	W	4	23.900	32.950	43.700	49.900	54.400
3	2	F	M	1	37.800	37.800	37.800	37.800	37.800
3	2	F	W	0
3	2	L	M	0
3	3	F	M	8	27.100	28.250	31.650	37.750	59.300
3	3	F	W	5	17.500	33.800	46.800	49.100	52.100
3	5	F	M	6	13.600	18.700	36.400	44.300	64.700
3	5	F	W	0
3	6	F	M	47	19.200	25.600	29.400	37.700	46.200
3	6	F	W	2	38.100	38.100	42.500	46.900	46.900
3	7	L	M	25	16.000	21.700	25.300	31.100	34.500
3	7	L	W	1	20.400	20.400	20.400	20.400	20.400
3	8	L	M	0
3	8	L	W	2	47.500	47.500	53.150	58.800	58.800
3	9	F	M	3	23.200	23.200	38.500	38.800	38.800
3	9	F	W	2	21.500	21.500	24.950	28.400	28.400
3	10		M	1	32.600	32.600	32.600	32.600	32.600
3	10	F	M	15	22.200	28.500	40.000	42.000	51.400
3	10	F	W	1	37.000	37.000	37.000	37.000	37.000
3	11	F	M	0
3	12	F	M	7	22.400	25.900	32.100	34.700	35.500
3	12	F	W	4	19.900	25.850	34.150	41.800	47.100
3	12	L	M	6	21.500	24.300	25.150	37.300	38.800
3	12	L	W	3	26.600	26.600	34.900	54.900	54.900

Spende	Zentrum	GCSF-Typ	Geschlecht	n	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
3	13	F	M	10	22.300	28.000	31.150	35.700	43.800
3	14	F	M	6	25.400	30.300	37.650	38.600	48.300
3	14	F	W	2	20.600	20.600	26.450	32.300	32.300
3	14	L	M	26	20.200	27.700	32.250	38.400	55.100
3	14	L	W	7	19.800	21.300	32.100	42.400	49.200
4	1	F	M	3	19.800	19.800	38.000	69.400	69.400
4	1	F	W	2	30.900	30.900	44.750	58.600	58.600
4	2	F	M	1	54.200	54.200	54.200	54.200	54.200
4	2	F	W	0
4	2	L	M	0
4	3	F	M	8	24.900	25.650	36.000	44.650	67.100
4	3	F	W	3	18.800	18.800	27.300	34.400	34.400
4	5	F	M	4	14.600	27.050	42.300	45.300	45.500
4	5	F	W	0
4	6	F	M	38	13.200	29.200	39.700	50.300	66.900
4	6	F	W	2	25.600	25.600	30.650	35.700	35.700
4	7	L	M	16	13.200	17.050	25.250	27.650	40.200
4	7	L	W	0
4	8	L	M	0
4	8	L	W	2	10.700	10.700	27.700	44.700	44.700
4	9	F	M	2	26.200	26.200	35.050	43.900	43.900
4	9	F	W	1	24.400	24.400	24.400	24.400	24.400
4	10		M	0
4	10	F	M	9	16.800	28.700	43.500	53.600	61.000
4	10	F	W	0
4	11	F	M	0
4	12	F	M	5	34.900	38.600	40.400	48.000	48.500
4	12	F	W	2	38.200	38.200	43.200	48.200	48.200
4	12	L	M	3	34.200	34.200	36.200	53.000	53.000
4	12	L	W	1	34.100	34.100	34.100	34.100	34.100

Spende	Zentrum	GCSF-Typ	Geschlecht	n	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
4	13	F	M	8	18.790	39.650	42.800	48.500	55.100
4	14	F	M	0
4	14	F	W	0
4	14	L	M	2	36.100	36.100	37.050	38.000	38.000
4	14	L	W	1	43.500	43.500	43.500	43.500	43.500
5	1	F	M	0
5	1	F	W	0
5	2	F	M	0
5	2	F	W	0
5	2	L	M	0
5	3	F	M	3	26.300	26.300	32.300	49.600	49.600
5	3	F	W	0
5	5	F	M	0
5	5	F	W	0
5	6	F	M	0
5	6	F	W	0
5	7	L	M	1	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000
5	7	L	W	0
5	8	L	M	0
5	8	L	W	0
5	9	F	M	1	29.700	29.700	29.700	29.700	29.700
5	9	F	W	1	29.400	29.400	29.400	29.400	29.400
5	10		M	0
5	10	F	M	0
5	10	F	W	0
5	11	F	M	0
5	12	F	M	0
5	12	F	W	0
5	12	L	M	0
5	12	L	W	0

Spende	Zentrum	GCSF-Typ	Geschlecht	n	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
5	13	F	M	0
5	14	F	M	0
5	14	F	W	0
5	14	L	M	0
5	14	L	W	0

8.2.2. Zielvariable Separationserfolg

Granulozyten im Präparat
getrennt nach Zentrum, G-CSF-Typ und Geschlecht

Spende	Zentrum	GCSF-Typ	Geschlecht	n	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
1	1	F	M	4	3.000	3.250	3.550	4.400	5.200
1	1	F	W	6	4.000	4.700	5.250	5.800	6.100
1	2	F	M	2	1.100	1.100	5.700	10.300	10.300
1	2	F	W	2	0.780	0.780	1.235	1.690	1.690
1	2	L	M	1	7.400	7.400	7.400	7.400	7.400
1	3	F	M	18	0.550	3.600	3.970	4.700	9.900
1	3	F	W	12	1.330	3.350	4.620	5.300	7.100
1	5	F	M	8	0.590	1.675	2.725	4.250	6.850
1	5	F	W	1	0.580	0.580	0.580	0.580	0.580
1	6	F	M	60	1.180	2.785	3.390	3.999	5.760
1	6	F	W	3	2.580	2.580	3.160	6.170	6.170
1	7	L	M	49	1.480	3.530	4.120	4.530	5.640
1	7	L	W	1	3.020	3.020	3.020	3.020	3.020
1	8	L	M	2	2.100	2.100	4.145	6.190	6.190
1	8	L	W	3	2.100	2.100	3.800	4.930	4.930
1	9	F	M	4	0.490	1.015	2.230	5.010	7.100
1	9	F	W	2	1.080	1.080	3.745	6.410	6.410

Spende	Zentrum	GCSF-Typ	Geschlecht	n	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
1	10		M	1	0.600	0.600	0.600	0.600	0.600
1	10	F	M	23	0.570	1.930	2.400	3.920	4.500
1	10	F	W	1	2.550	2.550	2.550	2.550	2.550
1	11	F	M	0
1	12	F	M	12	2.500	3.980	4.350	4.665	4.910
1	12	F	W	8	2.520	4.400	5.235	5.800	6.600
1	12	L	M	14	1.800	3.700	4.230	5.400	6.970
1	12	L	W	6	3.810	3.830	4.405	5.660	5.700
1	13	F	M	15	3.010	3.700	4.200	4.600	5.700
1	14	F	M	14	2.940	3.870	4.890	5.440	7.720
1	14	F	W	3	3.510	3.510	6.100	6.210	6.210
1	14	L	M	39	0.360	1.920	3.100	4.400	7.800
1	14	L	W	8	1.360	1.755	2.800	3.355	4.300
2	1	F	M	4	4.700	4.750	5.000	5.200	5.200
2	1	F	W	4	2.640	4.120	5.600	5.600	5.600
2	2	F	M	1	1.070	1.070	1.070	1.070	1.070
2	2	F	W	1	2.400	2.400	2.400	2.400	2.400
2	2	L	M	0
2	3	F	M	13	0.600	2.800	4.330	5.900	6.850
2	3	F	W	8	1.900	2.795	4.450	7.285	7.500
2	5	F	M	8	0.600	1.980	5.370	6.555	7.450
2	5	F	W	1	0.400	0.400	0.400	0.400	0.400
2	6	F	M	53	1.020	3.190	3.980	4.660	16.100
2	6	F	W	3	3.780	3.780	3.880	3.930	3.930
2	7	L	M	40	0.930	2.575	3.800	4.215	6.920
2	7	L	W	1	1.650	1.650	1.650	1.650	1.650
2	8	L	M	0
2	8	L	W	2	1.900	1.900	3.100	4.300	4.300
2	9	F	M	4	1.150	1.640	3.365	6.100	7.600
2	9	F	W	1	2.130	2.130	2.130	2.130	2.130

Spende	Zentrum	GCSF-Typ	Geschlecht	n	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
2	10		M	1	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600
2	10	F	M	18	0.520	1.700	2.985	4.100	6.800
2	10	F	W	1	3.240	3.240	3.240	3.240	3.240
2	11	F	M	0
2	12	F	M	9	3.280	3.500	4.200	5.100	6.400
2	12	F	W	4	2.200	3.950	6.290	6.990	7.100
2	12	L	M	9	2.120	3.200	3.590	4.700	6.700
2	12	L	W	6	3.300	3.700	4.040	4.840	6.010
2	13	F	M	10	2.700	3.500	3.850	5.400	6.100
2	14	F	M	12	2.870	4.880	5.795	6.360	7.190
2	14	F	W	3	2.780	2.780	5.150	5.260	5.260
2	14	L	M	37	0.680	2.300	3.500	4.290	7.200
2	14	L	W	7	1.770	2.100	2.260	4.100	5.320
3	1	F	M	4	1.900	3.450	5.450	6.900	7.900
3	1	F	W	4	3.900	4.250	4.700	5.750	6.700
3	2	F	M	1	2.920	2.920	2.920	2.920	2.920
3	2	F	W	0
3	2	L	M	0
3	3	F	M	8	3.500	3.900	5.345	9.550	10.500
3	3	F	W	5	1.850	3.380	7.610	8.200	10.500
3	5	F	M	6	0.600	2.790	3.460	7.300	8.000
3	5	F	W	0
3	6	F	M	47	2.470	3.740	4.710	5.720	16.200
3	6	F	W	2	2.600	2.600	4.100	5.600	5.600
3	7	L	M	23	1.470	3.330	4.180	4.860	5.590
3	7	L	W	1	2.020	2.020	2.020	2.020	2.020
3	8	L	M	0
3	8	L	W	1	8.800	8.800	8.800	8.800	8.800
3	9	F	M	3	1.900	1.900	2.550	8.020	8.020
3	9	F	W	2	2.220	2.220	4.450	6.680	6.680

Spende	Zentrum	GCSF-Typ	Geschlecht	n	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
3	10		M	1	1.200	1.200	1.200	1.200	1.200
3	10	F	M	15	1.380	2.470	3.500	5.840	7.500
3	10	F	W	1	2.200	2.200	2.200	2.200	2.200
3	11	F	M	0
3	12	F	M	6	4.630	4.890	6.375	7.300	10.830
3	12	F	W	4	2.500	3.700	5.700	6.600	6.700
3	12	L	M	6	4.600	5.250	5.650	5.930	7.800
3	12	L	W	3	4.650	4.650	6.010	7.000	7.000
3	13	F	M	10	1.100	4.260	4.450	5.030	5.700
3	14	F	M	6	6.740	7.060	7.530	7.900	8.100
3	14	F	W	2	2.520	2.520	3.150	3.780	3.780
3	14	L	M	26	0.700	2.600	3.750	5.100	9.200
3	14	L	W	6	1.440	2.760	2.935	3.260	6.300
4	1	F	M	3	2.900	2.900	6.500	13.000	13.000
4	1	F	W	2	3.800	3.800	4.000	4.200	4.200
4	2	F	M	1	1.470	1.470	1.470	1.470	1.470
4	2	F	W	0
4	2	L	M	0
4	3	F	M	8	4.100	4.530	4.905	9.150	14.300
4	3	F	W	3	1.700	1.700	2.550	4.780	4.780
4	5	F	M	4	2.820	3.480	5.300	8.115	9.770
4	5	F	W	0
4	6	F	M	38	1.667	4.540	6.197	7.790	21.300
4	6	F	W	2	3.360	3.360	3.605	3.850	3.850
4	7	L	M	16	1.190	3.205	3.560	4.655	6.670
4	7	L	W	0
4	8	L	M	0
4	8	L	W	2	3.400	3.400	5.100	6.800	6.800
4	9	F	M	2	5.510	5.510	7.255	9.000	9.000
4	9	F	W	1	0.780	0.780	0.780	0.780	0.780

Spende	Zentrum	GCSF-Typ	Geschlecht	n	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
4	10		M	0
4	10	F	M	9	1.260	3.600	6.100	7.800	12.300
4	10	F	W	0
4	11	F	M	0
4	12	F	M	4	4.720	4.725	7.815	11.650	12.400
4	12	F	W	2	6.900	6.900	7.840	8.780	8.780
4	12	L	M	3	6.620	6.620	7.700	10.900	10.900
4	12	L	W	1	5.460	5.460	5.460	5.460	5.460
4	13	F	M	9	4.830	5.000	5.200	5.800	6.900
4	14	F	M	0
4	14	F	W	0
4	14	L	M	2	2.500	2.500	3.770	5.040	5.040
4	14	L	W	1	3.160	3.160	3.160	3.160	3.160
5	1	F	M	0
5	1	F	W	0
5	2	F	M	0
5	2	F	W	0
5	2	L	M	0
5	3	F	M	3	3.900	3.900	6.100	10.000	10.000
5	3	F	W	0
5	5	F	M	0
5	5	F	W	0
5	6	F	M	0
5	6	F	W	0
5	7	L	M	1	4.580	4.580	4.580	4.580	4.580
5	7	L	W	0
5	8	L	M	0
5	8	L	W	0
5	9	F	M	1	6.900	6.900	6.900	6.900	6.900
5	9	F	W	1	2.790	2.790	2.790	2.790	2.790

Spende	Zentrum	GCSF-Typ	Geschlecht	n	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
5	10		M	0
5	10	F	M	0
5	10	F	W	0
5	11	F	M	0
5	12	F	M	0
5	12	F	W	0
5	12	L	M	0
5	12	L	W	0
5	13	F	M	0
5	14	F	M	0
5	14	F	W	0
5	14	L	M	0
5	14	L	W	0

8.2.3. Pathologische Befunde der Nachuntersuchungen

Pathologische Befunde der Nachuntersuchungen wurden folgendermaßen kategorisiert:

Kategorie 1: Weisses BB

Kategorie 2: sonst. Labor

Kategorie 3: Juckreiz

Kategorie 4: sonst. Klinik

Kategorie 5: Anderes

1. Nachuntersuchung nach 2 – 4 Wochen	Kategorie
WBC: 2,45 G/l, Neutrophile 1,28 G/l	1
WBC 2,99 G/l	1
Neutrophile 1.380/µl	1
WBC 2,69 G/l, Neutros 1,12 G/l	1

2 Wo Muskelschmerz, WBC 2,9 /nl	1
Monozyten 16%	1
WBC 2,8 /nl	1
Mono 15,1%	1
Monozyten 11%	1
Monozyten11%, Eosinophile 9%	1
Relative Eosinophilie	1
Hb 10,8; HK 32,1%	2
Hb 10,7 g/dl	2
Hkt 32,7% Hb 11,8	2
Hb 12,7 Hkt 36%	2
Hb 12,5; Hkt 36,5	2
niedriger Hb	2
Hb 11,8	2
GPT, GGT leicht erhöht	2
1 Woche Juckreiz	3
Juckreiz, Pickel, Haarausfall	3
generalisierter Juckreiz, vermindert leistungsfähig	3
Intermittierend Juckreiz Rücken	3
Juckreiz 1 Woche	3
10 Tage nach Spende Kopfschmerz	4
RR 170/110 mm Hg	4
Muskelkrämpfe nach 1,5 Wochen	4
pulsierende Schmerzen	4
Müdigkeit, Schwäche	4
Hypertonie	4
2 Wo Knochenschmerz	4
Durchfälle für einige Tage	4
bis 2 Tage danach grippales Gefühl	5
infektanfälliger für 1 Monat	5

Gefühl der trockenen Nase (auch Umzug)	5
bis 3 Wo leichtes Schwächegefühl, Eisensubstitution bis 1. Nachuntersuchung	5

2. Nachuntersuchung nach 2 Jahren	Kategorie
19% Monozyten, Na 146	1
WBC 3,7 /nl	1
Erys i.U., WBC 10,5 /nl	2
GPT 40, Arthritis seit 1 Jahr	2
PTT 26, Fibrinogen 356	2
Kreatinin 1,41, Na 148	2
Na 147	2
GPT, LDH leicht erhöht	2
PTT 37	2
GPT leicht erhöht	2
Urin-Status: positiv auf Eiweiß, Erys, Hb	2
K 3,4mmol/l, Nachtschweiß, Müdigkeit	2
Na, Harnstoff leicht erhöht, Hypertonus	2
Hb 11,8 bei hochfrequenter Vollblutspende	2
Juckreiz für ca. 6 Monate nach Spende	3
Juckreiz für ca. 3 Monate nach Spende	3
rezidivierend Juckreiz am Rücken, ca. alle 3 Wo	3
Nierenstein	4
Tinnitus	4
Schulter-Arm-Syndrom	4
Hypertensiv seit 2 J, Herz-Rhythmusstörungen, Beklemmungen, Nachtschweiß (Ehefrau verstorben)	4
Gelenkschmerzen, Ellenbogen, Handgelenke bds, Kniegelenk, re Ferse	4
Adipositas	5
erhöhte Anfälligkeit für Gerstenkörner	5

8.2.4. Mehrfachspende: Ergebnisse der Friedman-Anschlussstests

Zentrum	Zielvariable	Vergleich 1 mit 2 p-Wert	Vergleich 1 mit 3 p-Wert	Vergleich 2 mit 3 p-Wert
6	Stimulation	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
	Separation	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
14	Stimulation	$p = 0,0083$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
	Separation	$p = 0,7613$	$p = 0,0026$	$p = 0,0184$

9. Danksagungen

Vielen Dank an alle Kolleginnen und Kollegen in den teilnehmenden Blutspendeeinrichtungen für ihren Einsatz, die für die Studie nötigen Daten zu erfassen und weiterzureichen:

Herr Dr. Movassaghi, Charité, Berlin,

Herr PD Dr. Moog, Essen,

Herr Dr. Müller, Frankfurt am Main,

Herr PD Dr. Sachs, Leiter der Klinischen Prüfung, Gießen,

Herr Dipl.-Med. Harth, Halle,

Herr Prof. Kühnl, Hamburg,

Frau Prof. Dr. Barz aus, Jena,

Frau Dr. Edel, Leipzig,

Herr PD Dr. Schlenke, Lübeck (jetzt Münster),

Herr Prof. Dr. Eichler, Mannheim, (jetzt Homburg / Saar),

Herr Prof. Dr. Kretschmer, Marburg,

Herr PD Dr. Cassens, Münster, (jetzt Dortmund),

Herr Dr. Dada, Regensburg,

Herr Dr. Wiesneth, Ulm

Ebenfalls vielen Dank an Fr. Stefanie Fien für die Mitarbeit im Laufe der Studie bei der Ablage und elektronischen Datenerfassung.

Ein besonderes Dankeschön an Herrn PD Dr. Sachs, dem Leiter dieser Studie, für die ausgezeichnete und kollegiale Betreuung und Beratung bei der Auswertung und Verfassung dieser Arbeit.

Nicht zuletzt ein herzliches Dankeschön an Fr. Scheibelhut und Herr Dr. Bödeker von der AG medizinische Statistik für ihre kompetente und freundliche Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Ein besonderes Dankeschön an meine Eltern, denen ich mein Leben und meine Möglichkeiten verdanke, and to Jackie for making it worth while.

10. Literaturnachweis

¹ Junqueira, Carneiro; Histologie; Springer Verlag, S. 313,314

² Junqueira, Carneiro; Histologie Springer Verlag, S. 316

³ Junqueira, Carneiro; Histologie Springer Verlag, S. 336 ff

⁴ Ulich TR, del Castillo J, Souza L

Kinetics and mechanisms of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor-induced neutrophilia

Am J Pathol. 1988 Dec;133(3):630-8. Erratum in: Am J Pathol 1989 Feb;134(2):236

⁵ Itoh Y, Kuratsuji T, Tsunawaki S, Aizawa S, Toyama K

In vivo effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on normal neutrophil function and membrane effector molecule expression

Int J Hematol. 1991 Dec;54(6):463-9

⁶ Link H, Böhme A, Cornely OA, Höffken K, Kellner O, Kern WV, Mahlberg R, Maschmeyer G, Nowrousian MR, Ostermann H, Ruhnke M, Sezer O, Schiel X, Wilhelm M, Auner HW; Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO); Group Interventional Therapy of Unexplained Fever, Arbeitsgemeinschaft Supportivmassnahmen in der Onkologie (ASO) of the Deutsche Krebsgesellschaft (DKG-German Cancer Society)

Antimicrobial therapy of unexplained fever in neutropenic patients--guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO), Study Group Interventional Therapy of Unexplained Fever, Arbeitsgemeinschaft Supportivmassnahmen in der Onkologie (ASO) of the Deutsche Krebsgesellschaft (DKG-German Cancer Society).

Ann Hematol. 2003 Oct;82 Suppl 2:S105-17. Epub 2003 Sep 9

⁷ Herold G; Innere Medizin; S. 51ff

⁸ Laws HJ, Ammann RA, Lehrnbecher T

Diagnostic procedures and management of Fever in pediatric cancer patients

Klin Padiatr. 2005 Nov;217 Suppl 1:S9-16

⁹ Asano S.

Human granulocyte colony-stimulating factor: its basic aspects and clinical applications

Am J Pediatr Hematol Oncol. 1991 Winter;13(4):400-13

¹⁰ Lyman GH, Shayne M

Granulocyte colony-stimulating factors: finding the right indication

Curr Opin Oncol. 2007 Jul;19(4):299-307

¹¹ Yeghen T, Devereux S

Granulocyte transfusion: a review

Vox Sang. 2001;81(2):87-92

¹² Cesaro S, Chinello P, De Silvestro G, Marson P, Picco G, Varotto S, Pittalis S, Zanesco L

Granulocyte transfusions from G-CSF-stimulated donors for the treatment of severe infections in neutropenic pediatric patients with onco-hematological diseases

Support Care Cancer. 2003 Feb;11(2):101-6

¹³ Vamvakas EC, Pineda AA

Meta-analysis of clinical studies of the efficacy of granulocyte transfusions in the treatment of bacterial sepsis

J Clin Apher. 1996;11(1):1-9

-
- ¹⁴ Appelbaum FR, Bowles CA, Makuch RW, Deisseroth AB
Granulocyte transfusion therapy of experimental *Pseudomonas* septicemia: study of cell dose and collection technique
Blood. 1978 Aug;52(2):323-31
- ¹⁵ Price TH, Bowden RA, Boeckh M, Bux J, Nelson K, Liles WC, Dale DC
Phase I/II trial of neutrophil transfusions from donors stimulated with G-CSF and dexamethasone for treatment of patients with infections in hematopoietic stem cell transplantation
Blood. 2000 Jun 1;95(11):3302-9
- ¹⁶ Leavey PJ, Thurman G, Ambruso DR
Functional characteristics of neutrophils collected and stored after administration of G-CSF
Transfusion. 2000 Apr;40(4):414-9
- ¹⁷ Strumia MM
The effect of leukocytic cream injections in the treatment of the neutropenias
Am J Med Sci 1934;187:527-44
- ¹⁸ Brecher G, Wilbur KM, Cronkite EP
Transfusion of separated leukocytes into irradiated dogs with aplastic marrows
Proc Soc Exp Biol Med. 1953 Oct;84(1):54-6
- ¹⁹ Epstein RB, Chow HS
An analysis of quantitative relationships of granulocyte transfusion therapy in canines
Transfusion. 1981 May-Jun;21(3):360-2
- ²⁰ Ruthe RC, Andersen BR, Cunningham BL, Epstein RB
Efficacy of granulocyte transfusions in the control of systemic candidiasis in the leukopenic host
Blood 1978 Sep;52(3):493-8
- ²¹ Herzig RH, Wolff SN, Lazarus HM, Phillips GL, Karanes C, Herzig GP
High-dose cytosine arabinoside therapy for refractory leukemia
Blood, Aug 1983; 62: 361 – 369
- ²² Dahlke MB, Shah SL, Sherwood WC, Shafer AW, Brownstein PK
Priapism during filtration leukapheresis
Transfusion. 1979 Jul-Aug;19(4):482-6
- ²³ McCullough J, Weiblen BJ, Deinard AR, Boen J, Fortuny IE, Quie PG
In vitro function and post-transfusion survival of granulocytes collected by continuous-flow centrifugation and by filtration leukapheresis
Blood, Aug 1976; 48: 315 – 326
- ²⁴ Kelly KH, Bierman HR.
The continuous flow separation of leukocytes from human blood
Am J Med Sci. 1960 Oct;240:438-46
- ²⁵ Lee JH, Leitman SF, Klein HG
A controlled comparison of the efficacy of hetastarch and pentastarch in granulocyte collections by centrifugal leukapheresis
Blood. 1995 Dec 15;86(12):4662-6
- ²⁶ Schiffer CA, Aisner J, Dutcher JP, Wiernik PH
Sustained post-transfusion granulocyte count increments following transfusion of leukocytes obtained from donors with chronic myelogenous leukemia
Am J Hematol 1983; 15:65-74
- ²⁷ Freireich EJ, Levin RH, Whang J, Carbone PP, Bronson W, Morse EE
The Function and Fate of Transfused Leukocytes from Donors With Chronic Myelocytic Leukemia in Leukopenic Recipients

Ann N Y Acad Sci. 1964 Feb 28;113:1081-9

²⁸ Russell JA, Powles RL

A practical guide to granulocyte transfusion therapy
J Clin Pathol. 1976 May;29(5):369-79

²⁹ Bishop CR, Athens JW, Boggs DR, Warner HR, Cartwright GE, Wintrobe MM

Leukokinetic studies. 13. A non-steady-state kinetic evaluation of the mechanism of cortisone-induced granulocytosis
J Clin Invest. 1968 Feb;47(2):249-60

³⁰ Ghodsi Z, Strauss RG

Cataracts in neutrophil donors stimulated with adrenal corticosteroids
Transfusion. 2001 Dec;41(12):1464-8

³¹ Heuft HG, Goudeva L, Pulver N, Grigull L, Schwella N, Blasczyk R

A dose-response analysis of lenograstim plus dexamethasone for neutrophil mobilization and collection
Transfusion 2005 Apr;45(4):604-12

³² Bundesanzeiger, 5. November 2005

Bekanntmachung der Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) gemäß §§ 12 und 18 des Transfusionsgesetzes (TFG) (Novelle 2005)

³³ Illerhaus G, Wirth K, Dwenger A, Waller CF, Garbe A, Brass V, Lang H, Lange W

Treatment and prophylaxis of severe infections in neutropenic patients by granulocyte transfusions
Ann Hematol. 2002 May;81(5):273-81

³⁴ Dignani MC, Anaissie EJ, Hester JP, O'Brien S, Vartivarian SE, Rex JH, Kantarjian H, Jendiroba DB, Lichtiger B, Andersson BS, Freireich EJ

Treatment of neutropenia-related fungal infections with granulocyte colony-stimulating factor-elicited white blood cell transfusions: a pilot study
Leukemia. 1997 Oct;11(10):1621-30

³⁵ Glasser L, Huestis DW

Characteristics of stored granulocytes collected from donors stimulated with dexamethasone
Transfusion. 1979 Jan-Feb;19(1):53-6

³⁶ Mochizuki K, Kikuta A, Ohto H, Nemoto K, Ito M, Sano H, Akaihata M, Suzuki H

Extended storage of granulocyte concentrates mobilized by G-CSF with/without dexamethasone and collected by bag separation method
Transfus Med. 2007 Aug;17(4):296-303

³⁷ Appelbaum FR, Bowles CA, Makuch RW, Deisseroth AB

Granulocyte transfusion therapy of experimental *Pseudomonas* septicemia: study of cell dose and collection technique
Blood. 1978 Aug;52(2):323-31

³⁸ Grigg AP, Roberts AW, Raunow H, Houghton S, Layton JE, Boyd AW, McGrath KM, Maher D

Optimizing dose and scheduling of filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor) for mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells in normal volunteers
Blood. 1995 Dec 15;86(12):4437-45

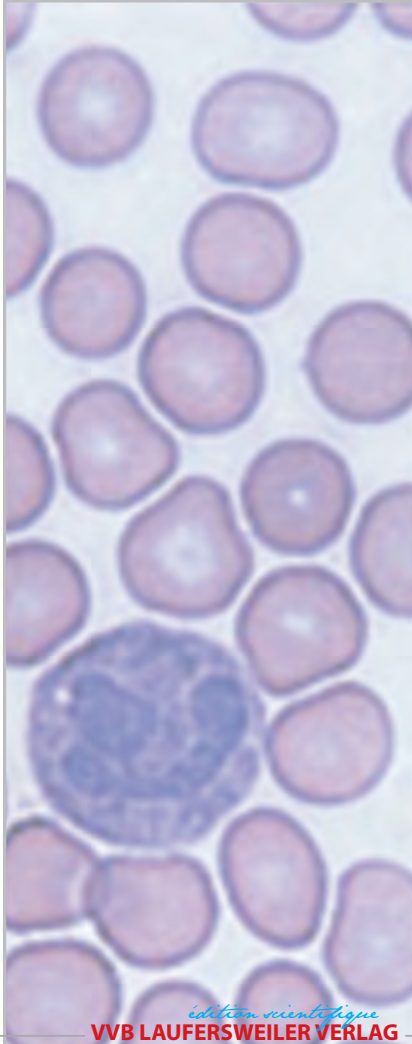
³⁹ Nuamah NM, Goker H, Kilic YA, Dagmoura H, Cakmak A

Spontaneous splenic rupture in a healthy allogeneic donor of peripheral-blood stem cell following the administration of granulocyte colony-stimulating factor (g-csf). A case report and review of the literature
Haematologica. 2006 May;91(5 Suppl):ECR08

-
- ⁴⁰ Falzetti F, Aversa F, Minelli O, Tabilio A
Spontaneous rupture of spleen during peripheral blood stem-cell mobilisation in a healthy donor.
Lancet 1999;353:555
- ⁴¹ Pitini V, Ciccolo A, Arrigo C, Aloï G, Micali C, La Torre F
Spontaneous rupture of spleen during peripheral blood stem cell mobilization in a patient with breast cancer
Haematologica 2000;85:559-60
- ⁴² Becker PS, Wagle M, Matous S, Swanson RS, Pihan G, Lowry PA, et al. Spontaneous splenic rupture following administration of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): occurrence in an allogeneic donor of peripheral blood stem cells
Biol Blood Marrow Transplant 1997;3:108
- ⁴³ Long-term safety of filgrastim (rhG-CSF) administration
Dennis L. Confer and John P. Miller
British Journal of Haematology 2007 Apr;137(1):77-8,
- ⁴⁴ Bennet, CL, Evens AM, Andritsos LA, Balasubramanian L, Mai M, Fisher MJ, Kuzel TM, Angelotta C, McKoy JM, Vose JM, Bierman PJ, Kuter DJ, Trifillio SM, Devine SM, Tallman M.S. (2006) Haematological malignancies developing in previously healthy individuals who received haematopoietic growth factors: report from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) project. *British Journal of Haematology*, 135, 642–650
- ⁴⁵ McCullough J, Clay M, Herr G, Smith J, Stroncek D
Effects of granulocyte-colony-stimulating factor on potential normal granulocyte donors
Transfusion. 1999 Oct;39(10):1136-4
- ⁴⁶ Moog R
Donor tolerance and results of stimulation with G-CSF alone or in combination with dexamethasone for the collection of granulocytes
J Clin Apher. 2004;19(3):115-8
- ⁴⁷ Stroncek DF, Yau YY, Oblitas J, Leitman SF
Administration of G-CSF plus dexamethasone produces greater granulocyte concentrate yields while causing no more donor toxicity than G-CSF alone
Transfusion. 2001 Aug;41(8):1037-44
- ⁴⁸ Gutierrez-Delgado F, Bensinger W
Safety of granulocyte colony-stimulating factor in normal donors
Curr Opin Hematol. 2001 May;8(3):155-60
- ⁴⁹ Cavallaro AM, Lilleby K, Majolino I, Storb R, Appelbaum FR, Rowley SD, Bensinger WI
Three to six year follow-up of normal donors who received recombinant human granulocyte colony-stimulating factor
Bone Marrow Transplant. 2000 Jan;25(1):85-9
- ⁵⁰ de la Rubia J, de Arriba F, Arbona C, Pascual MJ, Zamora C, Insunza A, Martínez D, Paniagua C, Díaz MA, Sanz MA
Follow-up of healthy donors receiving granulocyte colony-stimulating factor for peripheral blood progenitor cell mobilization and collection. Results of the Spanish Donor Registry
Haematologica. 2008 May;93(5):735-40
- ⁵¹ Stroncek DF, Matthews CL, Follmann D, Leitman SF
Kinetics of G-CSF-induced granulocyte mobilization in healthy subjects: effects of route of administration and addition of dexamethasone
Transfusion. 2002 May;42(5):597-602
- ⁵² Hübel K, Dale DC, Engert A, Liles WC
Current status of granulocyte (neutrophil) transfusion therapy for infectious diseases

J Infect Dis. 2001 Jan 15;183(2):321-328

⁵³ Cavallaro AM, Lilleby K, Majolino I, Storb R, Appelbaum FR, Rowley SD, Bensinger WI
Three to six year follow-up of normal donors who received recombinant human granulocyte colony-
stimulating factor
Bone Marrow Transplant. 2000 Jan;25(1):85-9



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5496-0

