

Aus der Abteilung für Transfusionsmedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Leiter: Prof. Dr. W. Mempel

Veränderungen im Immunsystem durch Leukapherese

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Waltraud Susanna Seisenberger

aus
München

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.med. W. Mempel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. J.E. Scherberich
Priv. Doz. Dr. U. Wintergerst
Priv. Doz. Dr. M. Suckfüll

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. S. Poley

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 24.Juli 2003

Meinen Eltern in Dankbarkeit

&

Oliver in Liebe

gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	3
1 Einleitung und Fragestellung	5
2 Materialien	13
2.1 Spenderblut	13
2.2 Antikörper	13
2.3 Chemikalien und Reagenzien	13
2.4 Geräte	14
3 Methoden	16
3.1 Quantitative Bestimmung der Leukozyten	16
3.1.1 Materialgewinnung	16
3.1.2 Zellpräparation	17
3.1.3 Messung am FACScan	17
3.1.4 Auswertung	18
3.1.5 Statistische Methoden	21
3.2 Bestimmung der intrazellulären Zytokinproduktion	22
3.2.1 Materialgewinnung	22
3.2.2 Zellpräparation	22
3.2.2.1 Dichtegradientenzentrifugation und Tiefgefrieren	
3.2.2.2 Auftauen und Ansetzen der Zellkultur	
3.2.2.3 Oberflächenmarkierung, Fixierung, Permeabilisierung und intrazelluläre Markierung	
3.2.3 Messung am FACScan	24
3.2.4 Auswertung	25
3.2.5 Statistische Methoden	27
4 Ergebnisse	28
4.1 Blutausstriche	28
4.2 Quantitative Veränderungen der Leukozyten	28
4.2.1 Leukozyten, Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten	28
4.2.2 Lymphozytensubpopulationen	30
4.2.3 CD8/HLA-DR-positive und CD4/CD45RA-positive Zellen	32

4.3	Funktionelle Veränderungen der Lymphozyten	33
4.3.1	Zytokinproduktion bei T-Helferzellen	34
4.3.1.1	INF- γ Produktion	
4.3.1.2	IL-2 Produktion	
4.3.2	INF- γ Produktion bei T-Suppressorzellen	36
4.3.3	INF- γ Produktion bei NK-Zellen	37
4.3.4	INF- γ und IL-2 Produktion bei T-Zellen	37
4.3.5	Übersichtstabellen zur intrazellulären Zytokinproduktion	38
5	Diskussion	39
5.1	Wertigkeit der Veränderung des Immunsystem durch eine Zytapherese	39
5.1.1	Leukozytenzahlen	39
5.1.2	Lymphozytensubpopulationen	41
5.1.3	Zytokinproduktion	43
5.2	Mögliche Auswirkungen auf den Spender	46
5.2.1	Zelluläre Verschiebungen	46
5.2.2	Veränderte Funktion der T- und NK-Zellen	47
5.3	Einfluß auf die Anwendung der Zytapherese	48
6	Zusammenfassung	50
7	Anhang	52
7.1	Zellzahlen	52
7.2	Zytokinproduktion	59
8	Literaturverzeichnis	65
8.1	Alphabetisches Autorenverzeichnis	65
8.2	Verzeichnis der Zitate	68

Verwendete Abkürzungen:

AG	Antigen
AK	Antikörper
BD	Becton Dickinson (Firmenname)
CD	Cluster of Determination
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CVID	common variable immune disease
DGTI	Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Infusionstherapie
DLI	Donor Leukocyte Infusion
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Flourescein isothiocyanate
G-CSF	Granulocytencolonestimulierender Faktor
GvHD	graft-versus-host disease
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leukocyte antigen
I.E.	internationale Einheit
IFN- γ	Interferon-gamma
IL-2	Interleukin-2
KMT	Knochenmarkstransplantation
MHC	major histocompatibility complex
MNC	mononuclear cell
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PBPC	peripheral blood progenitor cells
PBS	phosphat-bufferes saline

PBSacid	phosphat-bufferes saline with 0,1% sodiumazide
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin chlorophyll protein
PerCP-Cy5.5	Peridinin chlorophyll protein cyanine 5.5
TRALI	transfusion related acute lung injury

1. Einleitung und Fragestellung

Die vorliegende Arbeit untersucht in der ausgewählten Fragestellung die möglichen Auswirkungen auf das Immunsystem von Personen, die sich einer Zytapherese unterziehen. Da das Gebiet der Apheresetechnologie eine stete Entwicklung zeigt und die Zahl der Anwendungsgebiete steigt, gilt es, mögliche Folgen nicht nur für den Empfänger der Aphereseprodukte, sondern auch für den Spender zu untersuchen.

Die Apherese (vgl. griechisch φέρεσθαι: sich fortbewegen [1]) als Möglichkeit zur Auftrennung von Vollblut in korpuskuläre Elemente und Plasmabestandteile weist eine etwa 100jährige Geschichte auf. So gab man 1902 in Frankreich zum ersten Mal einem Blutspender nach Entfernung des Plasmas die roten Blutkörperchen zurück [2].

Eine Reihe von technischen Fortschritten ermöglichten die kontrollierte Trennung von Blut in seine Bestandteile. Plastikbehälter statt Glasflaschen und die *ex-vivo*-Zentrifugation stellen solche Entwicklungen dar. Einen weitverbreiteten Einsatz der Apherese verhinderte aber vor allem der große Reinigungs- und Sterilisationsaufwand.

Wichtig wurde die Methode mit dem Aufkommen der Chemotherapie in den 1960er Jahren; sie brachte die lebensbedrohliche Nebenwirkung der Knochenmarkssuppression mit sich. Die Anämie war mit roten Blutkörperchen, die man transfundieren konnte, gut beherrschbar, doch blieb der Therapiebedarf für die Thrombozytopenie und Leukozytopenie. Noch in den 1960er Jahren setzte man die Plättchentransfusion sparsam ein, da man eine Immunisierung des Empfängers befürchtete [3]. Um eine ausreichende Plättchenzahl zu erreichen, wurden nämlich die Thrombozyten mehrerer Spender gepoolt. Man mußte eine Methode entwickeln, um von einem HLA-kompatiblen Spender genug Plättchen zu gewinnen und sie einem entsprechenden Patienten zu transfundieren. Dies gelang mit unterschiedlichen Geräten, die alle durch Zentrifugieren die Blutbestandteile trennten und spezielle Zellpopulationen anreichern konnten.

Zunächst wurde das Zentrifugieren noch als separater Schritt der Apherese durchgeführt; später wurde die Zentrifugation in den direkten Blutfluß integriert: vom Spender über die Zentrifuge direkt zurück. Es erfolgte eine Aufspaltung in Erythrozyten, buffy coat und Thrombozyten nach ihren physikalischen Eigenschaften. Durch gezieltes Absaugen einer Schicht konnten die gewünschten Bestandteile gewonnen werden.

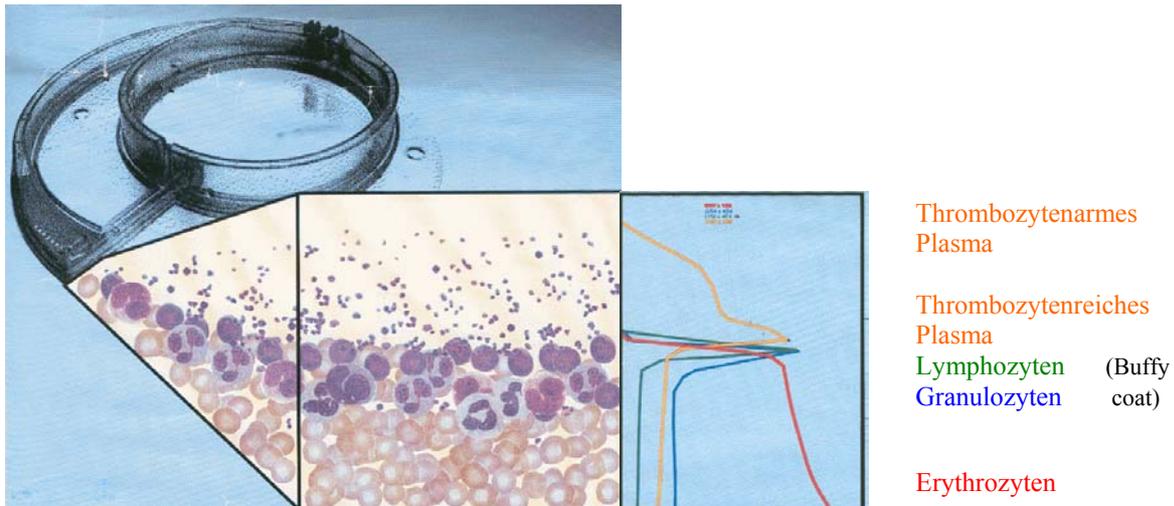


Abb. 1: Auftrennung der Blutbestandteile durch Zentrifugation

Beide Prinzipien, die kontinuierliche (stete Entnahme, Aufspalten von antikoaguliertem Vollblut und Rückgabe nicht abgesammelter Bestandteile) und die diskontinuierliche Separierungsmethode (abwechselnde Sammlung und Rückgabe der Blutbestandteile), sind bis heute aktuell und im Einsatz.

Man konnte so ausreichend Thrombozyten gewinnen, und die hämorrhagische Diathese trat als Todesursache bei Knochenmarksuppression immer mehr in den Hintergrund. Daran starben zwischen 1965 und 1971 ca. 11%; die Infektion blieb mit 69% als Haupttodesursache zu bekämpfen [4]. Die dazu notwendigen Granulozyten konnten zunächst nicht den Plättchen ähnlich angereichert werden, da beim Gesunden nur 20% im Blut zirkulieren. Um eine effektive Zellzahl zu erreichen, setzte man zunächst Produkte von CML-Patienten ein. Die Sorge, maligne oder deformierte Zellen zu transfundieren, und nicht zuletzt die begrenzte Anzahl an geeigneten Personen legten nahe, Granulozyten in ausreichenden Mengen von gesunden Spendern zu gewinnen. Da Granulozyten ein sehr ähnliches spezifisches Gewicht wie Erythrozyten besitzen, versuchte man durch den Einsatz von Sedimentationsverstärkern,

wie Hydroxyethylstärke die ungünstigen physikalischen Eigenschaften zu überwinden und eine bessere Ausbeute zu erzielen.

Die im peripheren Blut des gesunden Spenders zirkulierende Granulozytenzahl versuchte man zunächst durch die Gabe von Kortikoiden und später von Granulozytenwachstumsfaktoren zu erhöhen.

Als weitere Separierungsmethode von Granulozyten wurden auch verschiedene Filtersysteme eingesetzt. Im Gegensatz zur Zentrifugation, die keine Zellschäden hinterläßt, waren morphologische Veränderungen erkennbar. Mit dem Bekanntwerden von Nebenwirkungen bei Spendern, die man auf eine Komplementaktivierung im Plasma durch die Filtration zurückführte, verlor diese Methode an Bedeutung [5].

Heute werden Granulozytenpräparate, deren Gabe an den Empfänger nicht unproblematisch ist (z.B. TRALI), nur noch selten und bei ausgewählter Fragestellung hergestellt (z.B. bei schwersten Infektionen bei Agranulozytose im Kindesalter); sie sind weitgehend durch den direkten Einsatz von Granulozytenwachstumsfaktoren am Patienten ersetzt.

Einen weiteren großen Schritt in der Aphereseentwicklung stellt die Entnahmemöglichkeit für Blutstammzellen dar.

Obwohl Maximow schon 1909 Stammzellen im zirkulierenden Blut vermutete, dauerte es viele Jahrzehnte, ehe es möglich war, dies zu nutzen. Erst in den 1950er und 1960er Jahren gelang es in Versuchen mit bestrahlten Ratten und Mäusen durch die Gabe von allogenen peripheren Leukozyten die Knochenmarksfunktion zu rekonstruieren und den Beweis für eine zirkulierende hämatopoetische Stammzelle zu erbringen [6].

Ab den späten 1970er Jahren versuchte man, die periphere Blutstammzelltransplantation bei CML-Patienten anzuwenden. Die geringe Anzahl an zirkulierenden Stammzellen machte 6 - 8 Apheresen nötig. Dieser für Patienten und Personal kaum akzeptable Aufwand mußte reduziert werden, sollte diese Methode in der Praxis sinnvoll einsetzbar sein. Zunächst wurde ein Anstieg der peripheren Blutstammzellen durch myelosuppressive Chemotherapie erreicht. Erst als man 1988 Zytokine zur Mobilisierung einsetzte, bot sich die Chance einer brauchbaren Methode, zumal die Zytokinstimulation nicht nur die Zahl der Apheresen reduzierte, sondern auch die Zeit zur Normalisierung des Blutbildes beim Patienten senkte.

Ein großer Vorteil der PBPC Transplantation gegenüber der KMT besteht darin, daß auf eine Narkose verzichtet werden kann. Zudem sind die Morbidität und die Kontamination bei Entnahme aus dem peripheren Blut geringer als bei Knochenmarkspunktionen. Auch auf die finanzielle Einsparungsmöglichkeit sei hingewiesen [7]. In den USA verdrängt die autologe periphere Stammzelltransplantation zunehmend die Knochenmarkstransplantation [8].

Durch Kenntnis der Histokompatibilität wurde neben der autologen Spende auch die allogene möglich. Die oben erwähnte Thrombozytenspende wird häufig und standardmäßig durchgeführt. Ein weiterer attraktiver Fortschritt besteht in der peripheren Blutstammzelltransplantation, die man seit den 1990er Jahren durchführt. Zögerte man zunächst, gesunden Spendern Zytokine zur Stammzellmobilisierung zu geben, verloren sich diese Bedenken, da keine Langzeitnebenwirkungen für die Spender beschrieben wurden [9]. Diese Transplantationsform gehört heute zum festen Bestandteil der Therapie hämatologischer Erkrankungen und einzelner solider Tumoren [10].

Seit einigen Jahren nutzt man auch die Möglichkeit der Lymphozytenapherese bei der Behandlung von Leukämien. Die sogenannte „Donor Leukocyte Infusion“ hilft vor allem, das Wiederauftreten der malignen Grunderkrankung und posttransplantare Infektionen zu vermeiden. Besonders bei CML-Patienten, die einen Rückfall nach allogener Transplantation erlitten haben, verspricht man sich durch die Gabe von Lymphozyten des allogenen Spenders einen immunologischen Antitumoreffekt (graft-versus-leukemia-effect). Die Epstein-Barr-Virus-Infektion und die Cytomegalie sind häufige posttransplantare Komplikationen, die sich aufgrund des defekten zellulären Immunsystems entwickeln. Durch die DLI erhofft man sich die rasche Rekonstruktion dieser Abwehrfunktion. Auch die Behandlung der EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankung ist möglich. Das Risiko einer GvHD steht der routinemäßigen Gabe von Spenderlymphozyten aber weiter entgegen. Auch kann es zu Panzytopenien kommen [11].

Therapiekonzepte der Zukunft entstehen eventuell durch die in Apheresen gewonnenen Monozyten, aus denen spezielle dendritische Zellen hergestellt werden können. Da sie sehr immunkompetent sind, sollen sie in verschiedenen Bereichen zum Einsatz kommen.

So bietet die präparative Hämapherese heute die Möglichkeit zur Gewinnung von Thrombozyten, Granulozyten, Lymphozyten, Erythrozyten, Monozyten und peripheren Blutstammzellen. Auch die Gewinnung von Plasma oder eine Multikomponentenapherese sind möglich. Demgegenüber steht das große Feld der therapeutischen Apherese. Hier wird versucht, durch Entfernung verschiedener Blutbestandteile (Plasma oder Zellen) eine Besserung bzw. Heilung zu erreichen. Beispiele sind Leukodepletion bei Leukämien mit extrem hoher Zellzahl (z. B. CML), Plasmapherese zur Reduktion von Antikörpern bei Autoimmunerkrankungen, wie dem systemischen Lupus erythematodes oder Vaskulitiden, und hämatologische Leiden, wie die therapierefraktäre Thrombozytopenie. Aber auch bei metabolischen (z.B. familiäre Hypercholesterinämie) und neurologischen Störungen (z.B. Myasthenia gravis oder Guillain-Barre-Syndrom) setzt man die therapeutische Apherese ein [12].

Durch die allogenen Spenden entstand das Problem, daß gesunde Personen einem Prozedere unterzogen werden, dessen Risiken und Folgen teilweise oder überhaupt nicht bekannt sind. Obwohl die Nebenwirkungen bei den therapeutischen Apheresen häufiger entstehen als bei Spenderapheresen, sind der Eingriff in die Physiologie des Körpers und die daraus resultierenden Folgen nicht zu unterschätzen [13].

Jede Apherese macht eine Antikoagulation nötig. Heute wird zumeist Citrat verwendet, das als Chelator Calcium bindet und die calciumabhängigen Gerinnungsreaktionen blockiert. Im Gegensatz zu Heparin führt es zu keiner systemischen Antikoagulation. Der Eingriff in den sensiblen Calciumhaushalt führt zu einer Verminderung des freien Calciums. Häufig kommt es zu Parästhesien, selten auch zu Spasmen oder Krämpfen. Auch eine Verlängerung der QT-Zeit im EKG wird beschrieben; sie kann zu Arrhythmien führen. Bei Patienten mit Niereninsuffizienz kann es zu einer metabolischen Alkalose kommen.

Ein weiteres Risiko stellen Flüssigkeitsveränderungen im intravaskulären Raum dar. Sowohl Hyper- wie Hypovolämie können bei Patienten mit Herz- oder Nierenerkrankungen zu Problemen führen. Auch Verdünnungseffekte haben unerwünschte Folgen. Mit dem Plasma werden auch Medikamente, wie zum Beispiel Aspirin oder Phenytoin, entfernt. Unter Umständen führt eine Verminderung von Enzymen oder Bindungsproteinen zu veränderten Medikamentenspiegeln.

Der plötzliche Zellverlust, der je nach Aphereseart die verschiedenen Populationen betrifft, scheint keine schwerwiegenden Nebenwirkung zu haben. Besonders ausführlich wurde das an Plättchenspendern untersucht. Ein Einfluß auf die Plasmaproteine durch Aktivierung trat besonders bei Filtersystemen auf. Es kam zum Beispiel zu Priapismen. Das war ein wesentlicher Grund für den Stop dieser Technik. Neben der Aktivierung des Komplementsystems werden auch Effekte auf das Kininsystem diskutiert. Häufig sind vasovagale Reaktionen, die sich durch Hypotension, Bradykardie und Übelkeit äußern. Durch die Venenpunktion kann es zu Hämatomen, Sklerosen und Thrombosen kommen [14].

Um die Zwischenfälle möglichst gering zu halten, führte man Kriterien ein, die mögliche Spender erfüllen müssen. Die Volljährigkeit und ein Gewicht von mindestens 50 kg sind im Normalfall gefordert. Über einen Fragebogen, den der mögliche Spender ausfüllt, versucht man gesundheitliche Risiken aufzudecken. Dort werden Grundkrankheiten der verschiedenen Organsysteme abgefragt. Auszuschließen sind in jedem Fall alle Spender mit infektiösen Erkrankungen - vor allem Hepatitis C, aktive Tuberkulose und HIV - da sie eine Gefahr für den Empfänger darstellen. Herzerkrankungen bedürfen einer genauen Untersuchung. Ein Augenmerk sollte auch auf Asthmatiker und Epileptiker gelegt werden. Schwangere und Wöchnerinnen sollten nicht apherisiert werden. Kritische Casus sind im Einzelfall abzuwägen.

Neben dem oben erwähnten Alter und Gewicht sind nach den Richtlinien bei der Spenderuntersuchung folgende Kriterien zu erfüllen [15]:

- Hämoglobin oder Hämatokrit: Frauen: ≥ 125 g/l oder $\geq 0,38\%$
Männer: ≥ 135 g/l oder $\geq 0,40\%$
- Blutdruck: systolisch: 100 - 180 mmHg
diastolisch: < 100 mmHg
- Puls: unauffällig (50 - 110/min)
- Temperatur: kein Fieber
- Gesamteindruck: keine erkennbaren Krankheitszeichen
- Gesamteiweiß im Serum: ≥ 60 g/l
- Leuko-, Erythro-, Thrombozyten, MCV: Normwerte

In den Richtlinien ist für jede Aphereseart explizit niedergelegt, wie oft gespendet werden darf. Ein sinnvolles Spendeintervall sollte - je nach Art der Apherese - 48 Stunden betragen; nicht mehr als 2 Apheresen pro Woche sind wünschenswert [16], bei Stammzellspendern kann sie aber u.U. an aufeinander folgenden Tagen durchgeführt werden.

Auf Grund des oben Gesagten wird klar, daß die Apherese für den Spender eine Reihe von Risiken mit sich bringt, die es - so gut es geht - zu minimieren gilt. Beim Empfänger wird meist eine Risiko-Nutzen-Abwägung durchgeführt. Für den gesunden Spender muß ein Maximum an Sicherheit gewährleistet sein. Beeinträchtigungen oder sogar gesundheitlicher Schaden können nicht riskiert werden.

Durch eine gezielte Überwachung der Vitalparameter während der Apherese (evtl. mittels Monitoring) werden vor allem akute Nebenwirkungen, wie allergische und vasovagale Reaktionen oder Citrateffekte, rasch erkannt und ggf. behandelt. Somit ist die akute Beeinträchtigung gering.

Kretschmer et al. untersuchten 1987 in einer multizentrischen Studie die häufigsten Nebenwirkungen bei Zytapheresen. Neben Hämolysen und lokalen Blutungen an der Einstichstelle waren dies Gerinnselbildungen und EKG-Veränderungen [17]. Er empfiehlt in einer Arbeit von 1989, breite Statistiken zu führen, um auch seltenere Komplikationen aufzudecken; vor allem mögliche Veränderungen des Immunsystems seien denkbar [18].

Das sehr komplexe und sensible Immunsystem scheint von der Apherese durch mehrere Faktoren beeinflusst werden zu können. Die Fremdoberfläche, mit der das Blut beim Separierungsvorgang in Kontakt kommt, und die Antikoagulation sind denkbare Auslöser für Veränderungen. Auch die Zytokine, die zur Mobilisierung von Blutzustammzellen eingesetzt werden, wirken auf das Immunsystem. Zudem gibt es vereinzelte subjektive Berichte von Spendern, die eine erhöhte Infektneigung nach Apherese beobachteten.

In der ausgewählten Fragestellung soll der kurzfristige Einfluß auf das zelluläre Immunsystem in der ersten Woche nach einer Zytapherese untersucht werden.

Folgende quantitative Veränderungen sollen im weißen Blutbild bestimmt werden: Gesamtleukozyten, Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Letztere auch noch in Subpopulationen: B-Zellen, NK-Zellen, T-Helfer- und T-Suppressorzellen.

Die qualitativen Veränderungen werden anhand der Zytokinproduktion (IL-2 und IFN- γ) der T- und NK-Zellen untersucht.

Da nur die Effekte des Apheresevorgangs auf das Immunsystem sichtbar werden sollten, wurde die Untersuchung an Spendern, die vor der Apherese keine Zytokin-stimulation erhielten, durchgeführt.

Mit der vorliegenden Arbeit sollen bisher nicht untersuchte mögliche Einflüsse der Apherese auf das Immunsystem des Spender aufgedeckt werden.

2. Materialien

2.1 Spenderblut

24 klinisch und klinisch-chemisch gesunde Probanden zwischen 19 und 58 Jahren (weiblich: 17 / männlich: 7) wurden im Rahmen der vom Arzneimittelrecht geforderten Qualitätskontrollen in der Abteilung für Transfusionsmedizin des Klinikums Großhadern München untersucht. Alle waren über etwaige Risiken aufgeklärt und mit der Untersuchung einverstanden.

2.2 Antikörper

Becton Dickinson, San Jose, USA

Simultest IMK-Lymphocyte Kit

Single-Color-Reagents (monoklonale AK gegen humane AG)

CD3 - PerCP-Cy5.5	Clone SK7
CD4 – PE	Clone SK3
CD8 – FITC	Clone SK1
CD16 – PE	Clone B73.1
CD45RA - FITC	Clone L48
CD45RO – PE	Clone UCHL-1
CD56 – PE	Clone NCAM16.2
Anti-HLA-DR – PE	Clone L243

PharMingen, San Diego, USA

Mouse Anti-Human IFN- γ – FITC IgG ₁	Clone B27
Rat Anti-Human IL-2 – FITC IgG _{2a}	Clone MQ1-17H12

2.3 Chemikalien und Reagenzien

B.Braun Melsungen AG, Melsungen

Aqua ad iniectabilia Braun

Heparin-Natrium Braun 25000 I.E./5 ml

Becton Dickinson, San Jose, USA

FACSafe

FACSRinse

FACSFlow

Biochrom KG, Berlin

Biocoll Separating Solution

PBS-Dulbecco w/o Ca²⁺ , Mg²⁺

LIFE TECHNOLOGIES, Paisley, Schottland

Fetales Kälberserum

Penicillin-Streptomycin

RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin mit 25mm Hepes Puffer

PharMingen, San Diego, USA

Cytofix/Cytoperm PlusTM Kit

SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Dimethylsulfoxide

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf

Ionomycin

Phorbol 12-Myristate 13-Acetate

2.4 Geräte

B.Braun Melsungen AG, Melsungen

Einmalspritze 20 ml

Becton Dickinson, San Jose, USA

FACScanTM , Flow Cytometer

FALCON 5 ml Round-Bottom Tubes

PRIMARIATM Tissue Culture Flask 50ml

Cobe Laboratories GmbH, Heimstetten

COBE Spectra

Dispomed Witt oHG, Gelnhausen

Perfusionsbesteck

Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

Standartips 5 µl, 20 µl und 100 µl

Greiner Labortechnik, Kremsmünster, Österreich

Zentrifugenröhrchen 50 ml

Rundbodenröhrchen 12 ml

Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Rotanta P

ROTO SILENTA/KS

IKA Labortechnik Jahnke und Kunkel, Staufen

Vibrofix VF1

Kabe, Nümbrecht

Primavette K3E

Nalge Nunc International, Wiesbaden

Nunc Cryo Tube™ Vials 1,8 ml

Sarstedt AG&Co, Nümbrecht

Einmal-Pateurpipetten 3,5 ml

SÜD-LABORBREDARF GmbH, Starnberg

SL-Pette

Sysmex GmbH, Norderstedt

KX-21 (Hämatologiegerät)

3. Methode

3.1 Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen

Zur Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen wurde eine Vollblutmethode mit Erythrozytenlyse in Anlehnung an das Protokoll „Direct Immunofluorescence Staining of whole Blood using a Lyse/No-Wash Procedure“ der Firma Becton Dickinson verwendet [19].

3.1.1 Materialgewinnung

24 klinisch und klinisch-chemisch gesunde Probanden zwischen 19 und 58 Jahren (weiblich: 17 / männlich: 7) wurden im Rahmen der vom Arzneimittelrecht geforderten Qualitätskontrollen in der Abteilung für Transfusionsmedizin des Klinikums Großhadern München untersucht. Es wurde eine Apherese des doppelten Blutvolumens mit dem COBE-Spectragerät im MNC-Programm durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein kontinuierliches Entnahmeverfahren, bei dem nahezu nur die mononukleären Zellen entnommen werden, während die restlichen Blutbestandteile sofort direkt dem Spender zurückgeleitet werden. Die Auftrennung der Bestandteile erfolgt durch Zentrifugation.

Alle Probanden waren nach Aufklärung mit den Blutentnahmen einverstanden. Da die Apheresen im Rahmen der Qualitätskontrollen durchgeführt wurden, verzichteten wir auf eine Votum der Ethikkommission (Einverständniserklärung siehe Anhang Seite 63/64):

Jedem Probanden wurde 2 ml EDTA-Blut in vorgefertigten Röhrchen aus einer peripheren Vene

- vor Apherese
- nach Apherese
- 24 Stunden nach Apherese
- 3 - 6 Tage nach Apherese

entnommen.

Noch am gleichen Tag erfolgte die durchflußzytometrische Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen.

Von jeder Probe wurde ein Blutaussstrich zum Ausschluß morphologischer Auffälligkeiten und ein Blutbild am KX-21 zur Bestimmung der Leukozytenzahl durchgeführt.

3.1.2 Zellpräparation

In sechs 5-ml-FALCON-Röhrchen werden je 10 µl AK-Gemisch des Simultest IMK-Lymphocyten Kits von BD pipettiert. In zwei weiteren Röhrchen zum einen 10 µl des CD8-FITC AK und 5 µl HLA-DR-PE AK zum anderen je 10 µl CD45RA-FITC AK, CD45RO-PE AK und CD4-PerCP AK vorgelegt.

Übersicht:

Röhrchen- Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8
FITC-AK	CD45	IgG	CD19	CD4	CD8	CD16/56	CD8	CD45RA
PE-AK	CD14	IgG	CD3	CD3	CD3	CD3	HLA-DR	CD45RO
PerCP-AK	/	/	/	/	/	/	/	CD4

Je 50 µl EDTA-Blut wurden zupipettiert und gemischt. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und im Dunkeln wurden 2 ml BD-Lyse des Simultest IMK-Lymphocyten Kits zugegeben. Nach weiteren 10 Minuten Inkubation erfolgte Zentrifugation mit 250 g für 5 Minuten ohne Bremse und Dekantierung des Überstands. Dieser Vorgang wurde nach Waschen mit PBSacid Puffer wiederholt. Zur durchflußzytometrischen Messung wurde jede Probe mit 400 µl PBSacid Puffer verdünnt.

3.1.3 Messung am FACScan

Die durchflußzytometrische Messung erfolgte am FACScan Durchflußzytometer der Firma BD. Zur Lichtanregung wurde ein 488nm-Argon-Ionen-Laser verwendet. Im optischen System kann der Lichtstrahl durch die Probe in zwei Streulicht- und drei Fluoreszenzkanälen detektiert werden. Das ungefilterte Spektrum des Vorwärts- bzw. Seitwärtskanals wird nach Ablenkungswinkel erfaßt. Zur Abgrenzung der Emissionsspektren von FITC (grünes Licht), PE (rotes Licht) und PerCP (violetteres Licht) werden Filter unterschiedlicher Wellenlänge verwendet: 530 nm (Bandbreite 30 nm), 585 nm (Bandbreite 42 nm) und 650 nm (mit allen langwelligeren Strahlen) [20].

Das Vorwärtsstreulicht (FSC) korreliert mit der Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (SSC) mit der Granularität [21]. Je nach Kopplung der fluoreszenzmarkierten Antikörper geben sie über die entsprechenden Antigene Aufschluß.

Als Software zur Messung wurde für Röhrchen 1 - 7 SimulSET von BD, für Röhrchen 8 CELLQuest von BD verwendet.

Pro Ansatz wurden 15000 Zellen gemessen. Dabei wurden i. d. R. die geforderten 2000 Lymphozyten im Gate erreicht [22].

3.1.4 Auswertung

Zur Unterscheidung der Leukozyten stehen maximal fünf Parameter zur Verfügung: Größe (Vorwärtsstreulicht), Granularität (Seitwärtsstreulicht) und zwei oder drei Oberflächeneigenschaften (AK-Fluoreszenz).

Die Auswertung der Doppelmarkierungen erfolgte in der Simulset-Software von BD, die Dreifarbenauswertung in CellQuest von BD.

Es wird jeweils der prozentuale Anteil der zu messenden Population angegeben.

Im ersten Schritt wurden die Lymphozyten eingegrenzt. Die Software setzte automatisch über ein „Backgating“ das Lymphozytengate. Dazu nutzt es die Streulichteigenschaften und die Oberflächeneigenschaften der Lymphozyten, die mit Röhrchen 1 getestet wurden. Sie sind klein und kaum granuliert, reagieren stark positiv mit dem Panleukozytenmarker CD45 und negativ mit dem Monozytenmarker CD14.

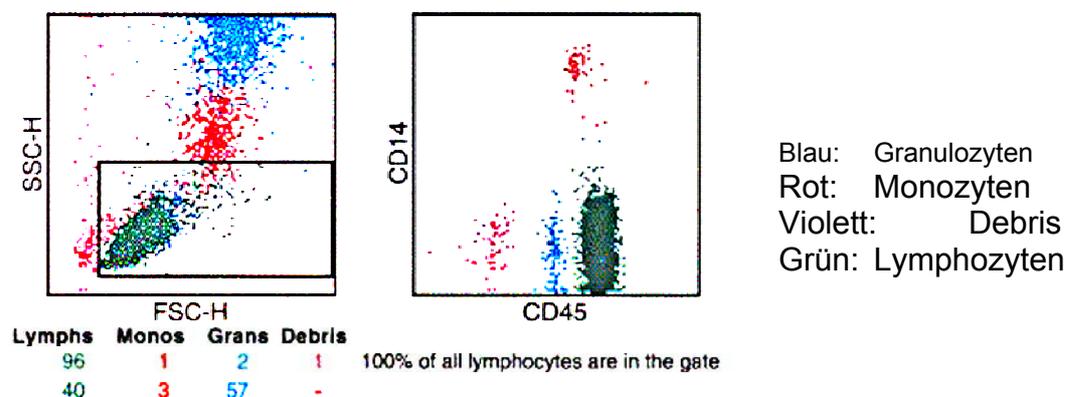


Abb. 2: LeucoGATE des SimulSET Lab Reports (eigene Messung vom 08.05.2000)

Im Gate sollten möglichst alle CD45 positiven Zellen und CD14 negativen Zellen erfasst werden („recovery“ der Lymphozyten $\geq 95\%$). Die Kontamination des Gates

mit nicht-lymphatischen Zellen sollte möglichst gering sein („purity“ $\geq 90\%$), da mit zunehmender Größe des Gates die NK-Zellen falsch hoch bestimmt würden (CD16 positive Granulozyten). Das Lymphozyten-Gate darf auch nicht zu eng gesetzt werden, da sonst kleine B-Zellen und aktivierte große Lymphozyten (meist T-Suppressorzellen) ausgeschlossen würden. Dies würde zu einer Verschiebung der T4/T8-Ratio führen [23].

Röhrchen 2 ist eine Negativkontrolle, die mit fluoreszenzmarkierten, aber nicht mit Oberflächenantigenen reagierenden Antikörpern gleichen Isotyps durchgeführt wird. Dies ist ein Maß für unspezifische Bindungen bzw. Autofluoreszenz.

Anhand der Negativkontrolle wird ein Fadenkreuz positioniert, das negative und positive Ereignisse im Lymphozytengate trennt. Im oberen linken Quadranten (Q1) erscheinen künftig alle orangerot, im unteren rechten (Q4) alle gelbgrün und im oberen rechten (Q2) alle doppelt orangerot/gelbgrün fluoreszierenden Ereignisse. Der untere linke Quadrant (Q3) enthält unspezifische Ereignisse.

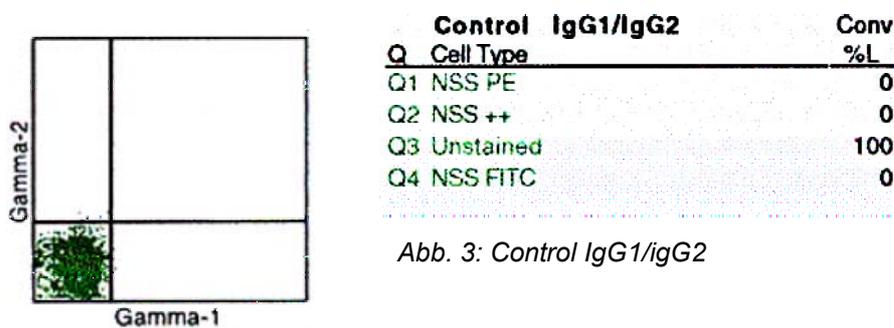


Abb. 3: Control IgG1/igG2

Mindestens 95% der gezählten Events aus Röhrchen 2 müssen in Q3 liegen, um reproduzierbare Messergebnisse zu erhalten [24].

In Röhrchen 3 – 6 wird stets der prozentuale Anteil der CD3-positiven Zellen (T-Lymphozyten) an der Gesamtlymphozytenpopulation bestimmt. Weichen zwei der Werte um mehr als 8% voneinander ab, ist der Testdurchlauf zu verwerfen [25].

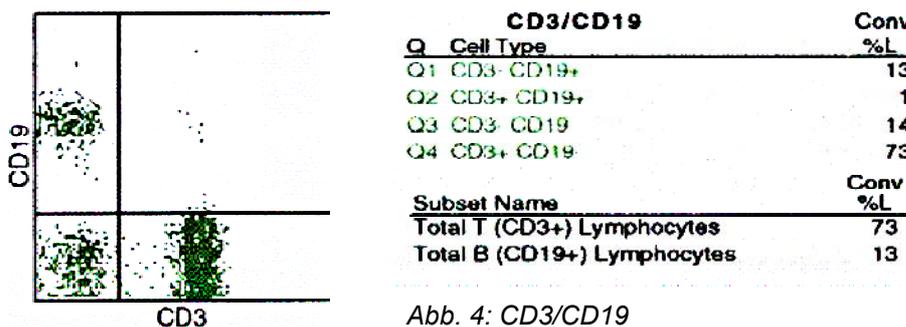
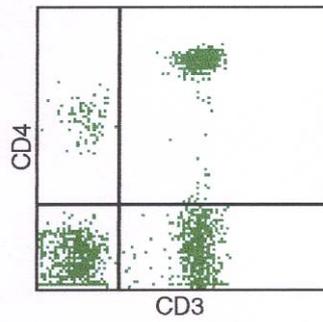
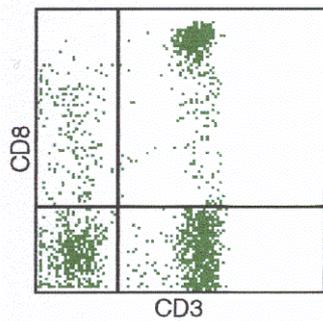


Abb. 4: CD3/CD19



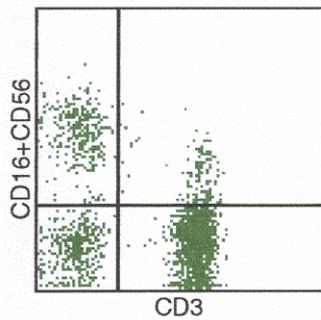
CD3/CD4		Conv
Q	Cell Type	%L
Q1	CD3- CD4+	4
Q2	CD3+ CD4+	41
Q3	CD3- CD4-	23
Q4	CD3+ CD4-	33
Subset Name		Conv
		%L
Total T (CD3+) Lymphocytes		74
T Helper (CD3+, CD4+) Lymphocytes		41

Abb. 5: CD3/CD4



CD3/CD8		Conv
Q	Cell Type	%L
Q1	CD3- CD8+	8
Q2	CD3+ CD8+	32
Q3	CD3- CD8-	18
Q4	CD3+ CD8-	42
Subset Name		Conv
		%L
Total T (CD3+) Lymphocytes		74
T Suppressor (CD3+,CD8+) Lymphs		32

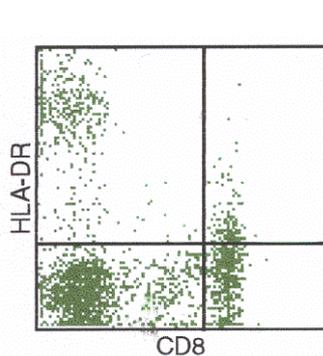
Abb. 6: CD3/CD8



CD3/CD16+56		Conv
Q	Cell Type	%L
Q1	CD3- CD16+/CD56+	14
Q2	CD3+ CD16+/CD56+	7
Q3	CD3- CD16-/CD56-	13
Q4	CD3+ CD16-/CD56-	67
Subset Name		Conv
		%L
Total T (CD3+) Lymphocytes		74
Total NK (CD16+/CD56+)Lymphocytes		14

Abb. 7: CD3/CD16+56

In Röhrchen 7 wurden aktivierte T – Zellen (CD8+/HLA-DR+) detektiert.



CD8/HLA-DR		Conv
Q	Cell Type	%L
Q1	CD8- DR+	18
Q2	CD8+ DR+	6
Q3	CD8- DR-	56
Q4	CD8+ DR-	20
Subset Name		Conv
		%L
Total CD8+ Lymphocytes		26
Total HLA-DR+ Lymphocytes		24
CD8+ HLA-DR+ Lymphocytes		6

Abb. 8: CD8/HLA-DR

Hier wurde das Fadenkreuz verlegt, um in Q2 bzw. Q4 nur die stark CD8-positiven Zellen, die wirklich T-Suppressorzellen entsprechen, zu erfassen. Mittelstark CD8- positive Zellen sind im westenlichen NK-Zellen oder $\gamma\delta$ -T-Zellen.

Das achte Röhrchen wurde getrennt ausgewertet. Die Population der T-Helferzellen wird aufgrund der CD4-Positivität und geringen Seitwärtsstreuung eingegrenzt (R1). Nur diese Population wird in einem eigenen Diagramm auf Expression von CD45RA und CD45RO analysiert. Naive (CD45RA) und Gedächtniszellen (CD45RO) werden gegatet (R2 bzw. R3) und der prozentuale Anteil bezogen auf R1 angegeben.

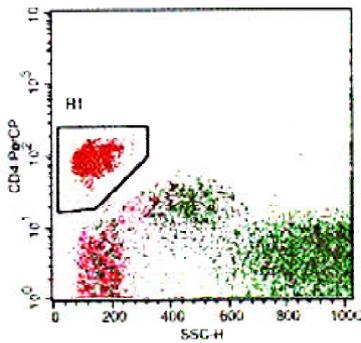


Abb. 9: Eingrenzung der T-Helferzellen

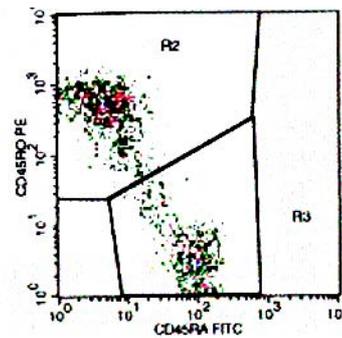


Abb. 10: Trennen von naiven und Gedächtniszellen

Die prozentualen Angaben wurden in Absolutzahlen umgerechnet:

Die Zahl der Leukozyten (LZ) pro μl ist aus der Messung am Hämatologiegerät KX-21 bekannt. Mit den Prozentangaben aus der obigen Messung für Lymphozyten (Ly%) bzw. der jeweiligen Subpopulation (Sp%) kann die Zellzahl (Sp) pro μl letzterer berechnet werden:

$$\text{Sp} = (\text{Ly}\% * \text{LZ}) * \text{Sp}\%$$

Die Daten wurden für jeden Probanden tabellarisch geordnet erfasst (siehe Anhang). Durch Umrechnung mit folgender Formel wurde zusätzlich die prozentuale Änderung ($\Delta\%$) eines Differenzwertes (D) bezüglich des Ausgangswertes (A) bestimmt:

$$\Delta\% = D * 100 / A$$

3.1.5 Statistische Methoden

Die statistischen Auswertung erfolgt für jeden Subpopulationstyp getrennt, aber äquivalent.

Von Interesse war die Veränderung der zweiten, dritten und vierten Probe (unmittelbar, 24 Stunden und 3 - 6 Tage nach Apherese) zum jeweiligen Ausgangswert (Abnahme vor Apherese) des Probanden. Für jede der drei Differenzen wurde aus den 24 Messungen der Mittelwert bestimmt und dessen Konfidenzintervall auf dem 95%-Niveau berechnet.

Überlappen sich die zugehörigen Konfidenzintervalle nicht, so ist der Unterschied mindestens auf dem 5%-Niveau signifikant [26].

Analog wurde mit den prozentualen Änderungen ($\Delta\%$) verfahren.

Als Software wurde das SAS-System für Windows Release 8.00 verwendet.

3.2 Bestimmung der intrazellulären Zytokinproduktion

Zur Bestimmung der intrazellulären Zytokinproduktion wurde in Anlehnung an die Protokolle "Dichtegradientenzentrifugation" von Coulter [27] und „FastImmune Intracellular Cytokine Staining Procedures“ von BD gearbeitet [28].

3.2.1 Materialgewinnung

Das Blut wurde bei den selben Abnahmen wie zu 3.1 gewonnen. Die dritte Messung fand nur bei den Probanden 3 - 24 statt.

Jedem Probanden wurde 20ml Blut in einer Einmalspritze, die zuvor mit Heparin-Natrium benetzt worden war, aus einer peripheren Vene

- vor Apherese
- nach Apherese
- 24 Stunden nach Apherese
- 3 - 6 Tage nach Apherese

entnommen. Noch am gleichen Tag erfolgten die Dichtegradientenzentrifugation und das Tiefgefrieren.

3.2.2 Zellpräparation

3.2.2.1 Dichtegradientenzentrifugation und Tiefgefrieren

In einem 50-ml-Zentrifugenröhrchen wurden 20 ml Biocoll pipettiert (Biocoll zuvor ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur lagern) und mit 20 ml Heparinblut vorsichtig überschichtet, wobei die Grenzschicht nicht durchbrochen wurde. Es erfolgte 20 Minuten Zentrifugation bei 800 g mit ausgeschalteter Bremse. Die sich an der Grenzschicht ablagernden mononukleären Zellen wurden mit einer Transferpipette abgenommen und in einem 12-ml-Rundbodenröhrchen in 10 ml PBS resuspendiert.

Nach einer erneuten Zentrifugation bei 800 g für 5 Minuten mit Bremse wurde der Überstand abgesaugt und 2 ml PBS zugegeben. Die gut gemischte Suspension wurde ein drittes Mal zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die abgesetzten Zellen in 2 ml PBS aufgenommen.

Am Hämatologiegerät KX-21 wurde die Zellzahl bestimmt. In allen Proben erfolgte die Einstellung einer Konzentration von ca. $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Zur Verdünnung verwendeten wir bei Bedarf PBS. Aus 2 ml dieser Suspension gewannen wir durch Zentrifugation (300 g für 5 Minuten ohne Bremse) ca. $10 \cdot 10^6$ Zellen.

Die Wiederaufnahme der Zellen erfolgte in 1,8 ml RMPI. Jeweils 0,9 ml davon wurden in ein NUNC-Röhrchen pipettiert und auf Eis gelagert. Tropfenweise erfolgte über ca. 30 Minuten die Zugabe von 0,9 ml FCS mit 10% DMSO. Bei -80°C wurden die ficollisierten Zellen für 24h zunächst in einem mit Propanol gefüllten Gefäß langsam tiefgefroren, danach in einem Metallständer für 5 Monate gelagert.

3.2.2.2 Auftauen und Ansetzten der Zellkultur

Wir stellten die NUNC-Röhrchen für ca. 5 Minuten in ein Wasserbad mit 37°C . Die Zellsuspension wurde mit 10 ml PBS in einem Rundbodenröhrchen gemischt und für 5 Minuten bei 250 g ohne Bremse zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte die Zugabe von 5,4 ml RMPI, 600 μl FCS, 4 μl Golgi Stop und 100 μl Streptomycin. Die Zellkultur wurde je zur Hälfte in zwei 50-ml-Tissue Culture Flasks angesetzt. Eine blieb unstimuliert, die zweite wurde mit 25 ng/ml PMA und 1 $\mu\text{g/ml}$ Ionomycin stimuliert. Wir kultivierten die Zellen für 270 Minuten bei 37°C in einer mit 5% CO_2 angereicherten Atmosphäre.

3.2.2.3 Oberflächenmarkierung, Fixierung, Permeabilisierung und intrazelluläre

Markierung

Mit der stimulierten und der unstimulierten Kultur wurde äquivalent verfahren. Nach Mischen wurde zur Kultur 3 ml Staining Buffer (PBSacid mit 1% hitzeinaktiviertem FCS mit pH 7,4 - 7,6) gegeben, in einem Rundbodenröhrchen gewaschen (Zentrifugation bei 250 g ohne Bremse) und in 200 μl Staining Buffer resuspendiert.

Die Oberflächenantikörper wurden in vier 5-ml-FALCON Röhrchen nach folgender Übersicht vorgelegt:

Röhrchennummer	1	2	3	4
PE-AK	CD16+CD56	CD8	CD4	CD4
PerCPCy5.5-AK	CD3	CD3	CD3	CD3

Je 50 µl der Zellsuspension (ca. $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml) wurden zugegeben und gemischt. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis und im Dunklen wurde mit 1 ml Staining Buffer gewaschen (Zentrifugation 250 g ohne Bremse).

Zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden 250 µl Cytotfix/Cytoperm-Lösung zugegeben, die nach 15 Minuten mit 1 ml Perm/Wash-Lösung durch Waschen wieder entfernt wurde. Für die intrazelluläre Markierung wurden in die Röhrchen 1 - 3 jeweils 5 µl FITC-markierter $\text{INF}\gamma$ -AK und in Röhrchen 4 5 µl FITC-markierter IL2-AK gegeben. Nach weiteren 30 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit 1 ml Perm/Wash-Lösung gewaschen. Zur durchflußzytometrischen Messung wurde mit 250 µl Staining Buffer verdünnt.

3.2.3 Messung am FACScan

Die durchflußzytometrische Messung erfolgte am FACScan von BD (vgl. 3.1.3).

Als Software wurde CELLQuest von BD verwendet. Pro Ansatz wurden 20000 Zellen gezählt.

Zuvor waren die einzelnen Fluorochrome, deren Zweier- und Dreierkombinationen in getrennten Ansätzen gemessen worden, um eine optimale Kompensation zu erreichen.

3.2.4 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der CELLQuest-Software von BD.

Folgende Interleukinproduktionen wurden registriert:

1. IFN- γ Produktion der NK-Zellen (1.Röhrchen)
2. IFN- γ Produktion der T-Suppressorzellen (2.Röhrchen)
3. IFN- γ Produktion der T-Helferzellen (3.Röhrchen)
4. IFN- γ Produktion der T-Zellen (2./3.Röhrchen)
5. IL-2 Produktion der T-Helferzellen (4.Röhrchen)

Das Vorgehen war bei allen Paaren äquivalent. Die Gates wurden jeweils von der unstimulierten in die korrespondierende stimulierte Probe kopiert.

Im ersten Schritt wurden die Leukozyten (R1) eingegrenzt.

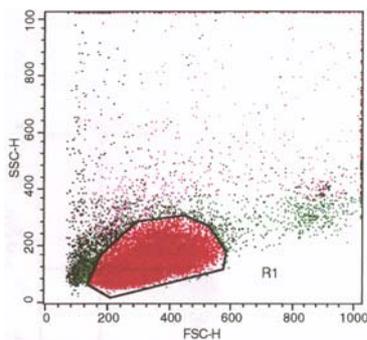


Abb. 11: Eingrenzen der Leukozyten

Nur diese Zellen wurden in einem zweiten Plot dargestellt und in CD3-positive und CD3-negative Zellen eingeteilt (R2). Der Prozentsatz von R2 an R1 wurde zwischen stimulierter und unstimulierter Probe verglichen; die Differenz betrug nicht mehr als 8%. Dies gilt für alle weiteren vergleichbaren Populationen.

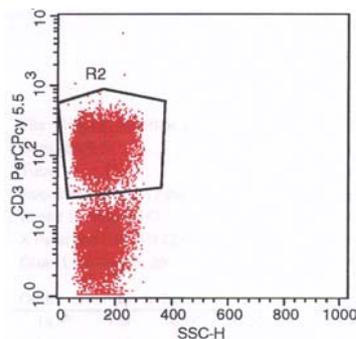


Abb. 12: CD3-positive Zellen

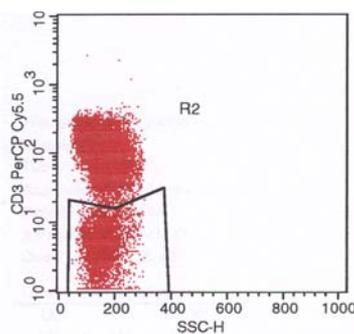


Abb. 13: CD3-negative Zellen

Die CD3-negativen Zellen wurden weiter für die Untersuchung der NK-Zellen, die CD3-positiven für die Untergliederung der T-Helfer- und T-Suppressorzellen betrachtet.

Als Drittes wurden die CD3-negativen bzw. CD3-positiven Zellen auf Expression eines weiteren Oberflächenmarkers untersucht.

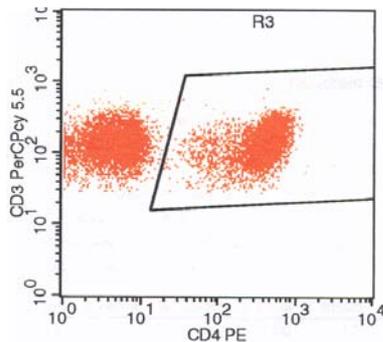


Abb. 14: CD4-positive Zellen

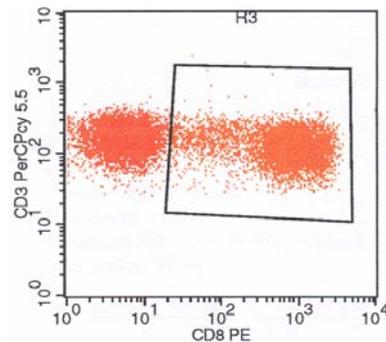


Abb. 15: CD8-positive Zellen

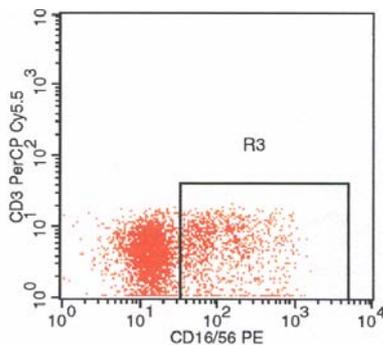


Abb. 16: CD16/56-positive Zellen

Es erfolgte die Eingrenzung von

- CD3+/CD4+ (T-Helferzellen)
 - CD3+/CD8+ (T-Suppressorzellen)
 - CD3-/CD16/56+ (NK-Zellen)
- Zellen (R3).

Im vierten Schritt wurden die zuletzt gegaten Populationen auf ihre Interleukinproduktion untersucht.

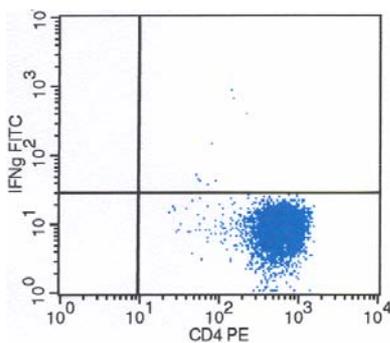


Abb. 17: unstimulierte Probe

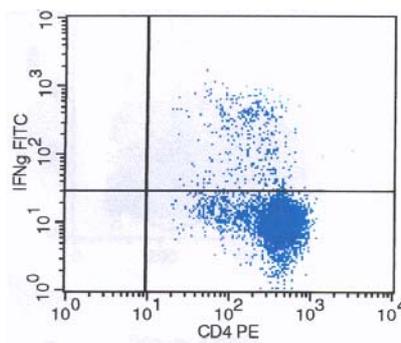


Abb. 18: stimulierte Probe

Es wurde der prozentuale Anteil der produzierenden Zellen an der im letzten Plot gegaten Population angegeben. Als tatsächliche Zytokinproduktion der Zellen wurde die Differenz der stimulierten und unstimulierten Probe angegeben, um keine unspezifischen Events mitzuzählen.

Für jede stimulierte Probe wurde auch der Fluoreszenz-Meanwert der zytokinproduzierenden Zellen bestimmt und damit das Maß für die Produktivität der einzelnen Zelle dokumentiert. Er ergab jedoch keine neuen Informationen und wurde daher nicht weiter statistisch bearbeitet.

Die Daten wurden für alle Probanden tabellarisch geordnet erfaßt (siehe Anhang).

3.2.5 Statistische Methoden

Analog zu 3.1.5 wurden auch hier von den Meßwerten drei Differenzen und die prozentualen Änderungen berechnet, um die jeweilige Veränderung zum Ausgangswert (Abnahme vor Apherese) ablesen zu können. Es wurden ebenfalls die Mittelwerte der 24 Einzelergebnisse gebildet und dessen Konfidenzintervall auf dem 95%-Niveau berechnet.

Als Software wurde das SAS-System für Windows Release 8.00 verwendet.

4. Ergebnisse

Die untersuchten Probanden wurden entsprechend der Apheresetermine nummeriert und alle Ergebnisse tabellarisch aufgelistet. Eine Nummer steht immer für denselben Probanden.

4.1 Blutausstriche

In keinem Blutausstrich konnten auffällige Befunde erhoben werden. Auf eine weitere Dokumentation wurde deshalb verzichtet.

4.2 Quantitative Veränderungen der Leukozyten

Die Zellzahlen pro μl sind für jede Untergruppe im Anhang aufgelistet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt im weiteren Text bzw. in den Tabellen in Form der statistisch bearbeiteten Daten (siehe 3.1.5), d.h. als Mittelwerte mit Konfidenzintervallen. Letztere werden im Text in Klammern aufgeführt.

In allen Graphiken sind auf der x-Achse die Werte entsprechend der statistischen Bearbeitung dargestellt :

- v für den Wert vor Apherese
- n – v für die Differenz der Werte nach und vor Apherese
- 1 – v für die Differenz der Werte am 1.Tag nach und vor Apherese
- 3 – v für die Differenz der Werte der 3.Messung nach und vor Apherese

4.2.1 Leukozyten, Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten

Im Rahmen der Lymphozytensubpopulationen wurden auch die Zahlen für die Leukozyten, Granulozyten, Monozyten und Gesamtlymphozyten bestimmt.

Die Gesamtleukozytenzahl sank um 475 (-921/-29) Zellen/ μl während der Apherese. Nach 24 Stunden stieg die Anzahl um 271 (-140/681) Zellen/ μl und am dritten Messtag um 533 (-14/1080) Zellen/ μl gegenüber dem Ausgangswert vor Apherese.

Die Veränderung der Leukozyten setzt sich aus den Schwankungen der Granulo-, Mono- und Lymphozyten zusammen. Die Kurven sind nachfolgend dargestellt:

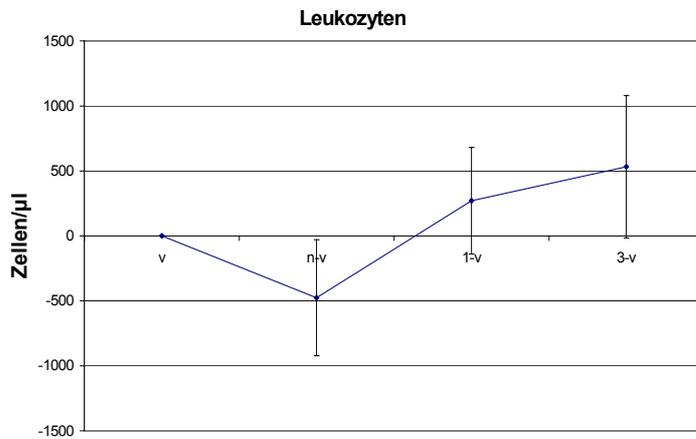


Abb. 19.: Mittelwert der Leukozytenzahl/μl mit Konfidenzintervallen

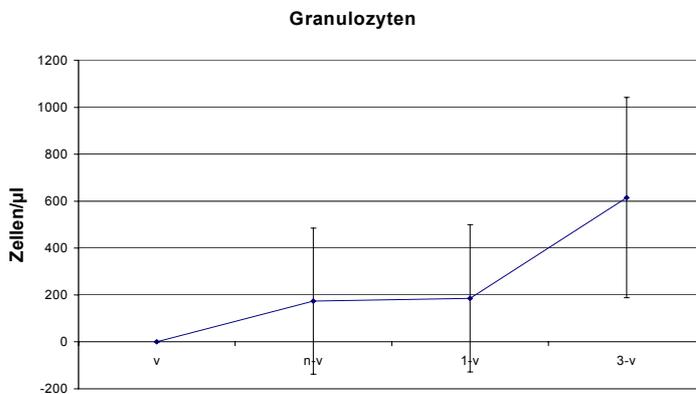


Abb. 20: Mittelwerte der Granulozytenzahlen/μl mit Konfidenzintervallen

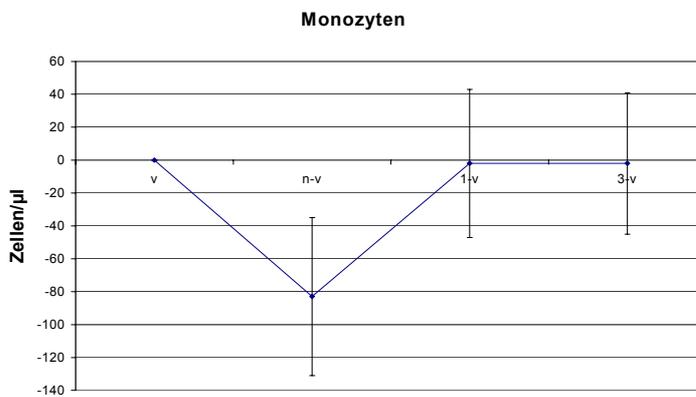


Abb. 21: Mittelwerte der Monozytenzahlen/μl mit Konfidenzintervallen

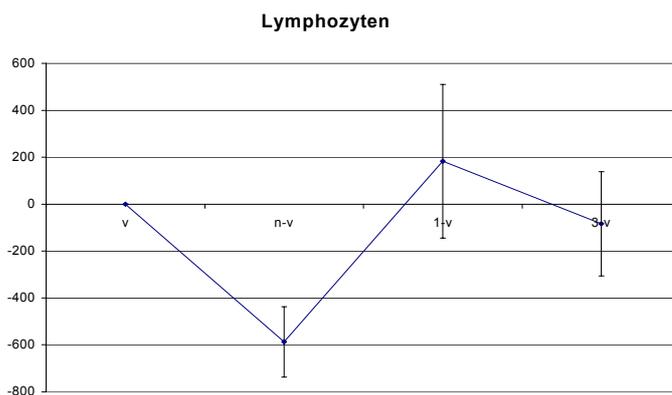


Abb. 22: Mittelwerte der Lymphozytenzahlen/μl mit Konfidenzintervallen

Der Leukozytenverlust nach Apherese setzt sich aus einem Minus an Monozyten und Lymphozyten zusammen, während zu diesem Zeitpunkt schon ein Plus an Granulozyten vorliegt. Der Überschuß nach 24 Stunden wird durch Granulozyten und Lymphozyten gebildet; Monozyten erreichen hier knapp den Ausgangswert. Der deutliche Anstieg der Granulozyten am 3. Messtag erklärt den Gesamtzuwachs der Leukozyten, denn sowohl Monozyten als auch Lymphozyten zeigen kaum eine Veränderung gegenüber dem Ausgangswert.

Übersicht: Mittelwerte mit den Konfidenzintervallen in Klammern; Angaben in Zellen/ μ l

	<i>nach Apherese</i>	<i>nach 24 Stunden</i>	<i>3. Meßtag</i>
<i>Leukozyten</i>	-475 (-921; -29)	+271 (-140; +681)	+533 (-14; +1080)
<i>Granulozyten</i>	+ 174 (-137; +485)	+186 (-129; +500)	+615 (+188; +1042)
<i>Monozyten</i>	-83 (-130; -35)	-2 (-48; +43)	-2 (-45; +41)
<i>Lymphozyten</i>	-587 (-736; -437)	+183 (-145; +511)	-84 (-307; +138)

Betrachtet man die prozentuale Änderung zum status quo vor Apherese, so ergibt sich folgendes Bild:

Übersicht: Angaben in Prozent bzgl. des Ausgangswerts

	<i>nach Apherese</i>	<i>nach 24 Stunden</i>	<i>3. Meßtag</i>
<i>Leukozyten</i>	-6	+4	+10
<i>Granulozyten</i>	+6	+5	+18
<i>Monozyten</i>	-19	+4	+3
<i>Lymphozyten</i>	-26	+11	-1

Den stärksten Schwankungen unterliegen die Lymphozyten, bei denen binnen 24 Stunden eine Zellzahländerung von 37% festzustellen ist. Bei den Monozyten zeigt sich im Gegensatz zu den Absolutzahlen sogar ein kleines Plus.

4.2.2 Lymphozytensubpopulationen

Die Mittelwertkurven der B-Zellen, T-Helfer-, T-Suppressorzellen und NK-Zellen verlaufen tendenziell ähnlich. Die Schwankungsbreite der B-Zellen ist dabei am geringsten, die der Helferzellen am größten. Am 3. Messtag zeigt sich bei den T-Zellen ein Minus, bei den B-Zellen ein kleines Plus. Die NK-Zellen weisen bei jeder Messung einen deutlichen Zellverlust auf.

B-Zellen

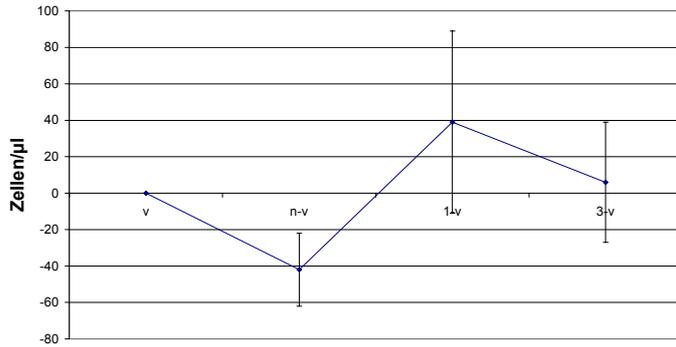


Abb.23: Mittelwerte der B-Zellen/ μ l mit Konfidenzintervallen

T-Helferzellen

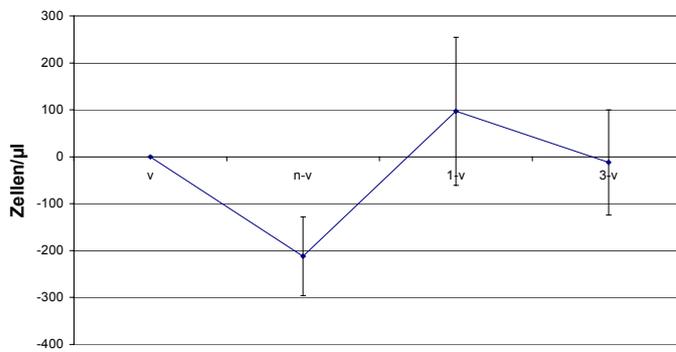


Abb.24: Mittelwerte der T-Helferzellen/ μ l mit Konfidenzintervallen

T-Suppressorzellen

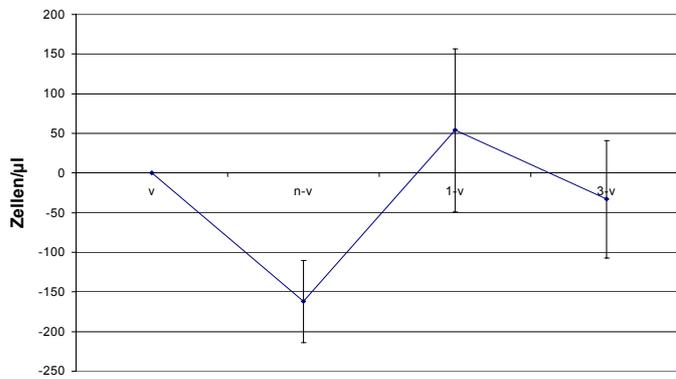


Abb.25: Mittelwerte der T-Suppressorzellen/ μ l mit Konfidenzintervallen

NK-Zellen

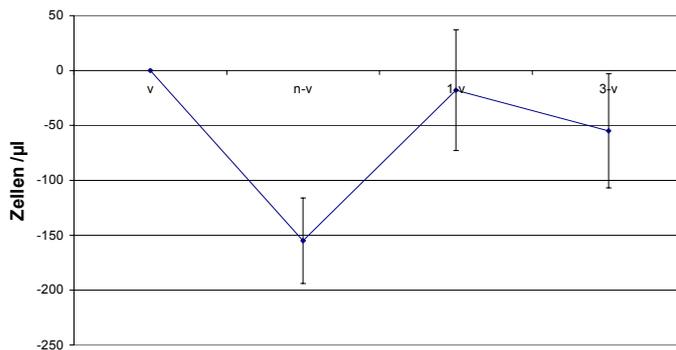


Abb.26: Mittelwerte der NK-Zellen/ μ l mit Konfidenzintervallen

Übersicht: Mittelwerte mit den Konfidenzintervallen in Klammern; Angaben in Zellen/ μ l

	<i>nach Apherese</i>	<i>nach 24 Stunden</i>	<i>3. Meßtag</i>
<i>B-Zellen</i>	-42 (-62; -22)	+39 (-12; +89)	+6 (-27; +39)
<i>T-Helferzellen</i>	-212 (-295; -128)	+97 (-61; +255)	-12 (-124; +100)
<i>T-Suppressorzellen</i>	-162 (-214; -110)	+54 (-48; +157)	-33 (-106; +41)
<i>NK-Zellen</i>	-155 (-194; -116)	-18 (-74; 37)	-55 (-106; -3)

Die prozentuale Änderung der B-, T-Helfer- und T-Suppressorzellen spiegelt das Bild der Lymphozyten (siehe 4.2.1) wider. Bei den NK-Zellen zeigt sich ein Verlust von 48% durch die Apherese.

Übersicht: Angaben in Prozent bzgl. des Ausgangswertes

	<i>nach Apherese</i>	<i>nach 24 Stunden</i>	<i>3. Meßtag</i>
<i>B-Zellen</i>	-15	+17	+8
<i>T-Helferzellen</i>	-19	+13	+2
<i>T-Suppressorzellen</i>	-25	+13	-1
<i>NK-Zellen</i>	-48	+1	-8

4.2.3 CD8/HLA-DR positive und CD4/CD45RA positive Zellen

Die aktivierten T-Suppressorzellen, die neben dem CD8 Antigen auch das HLA-DR Antigen auf ihrer Oberfläche tragen, zeigen einen Abfall nach Apherese und einen Anstieg nach 24 Stunden. Im Gegensatz zur Gesamtheit der T-Suppressorzellen steigen sie am 3.Meßtag weiter an.

Die Mittelwertkurve der CD45RA positiven T-Helferzellen (=naive T-Zellen) verläuft analog zur Kurve der Gesamthelferzellen.

Übersicht: Mittelwerte mit den Konfidenzintervallen in Klammern; Angaben in Zellen/ μ l

	<i>nach Apherese</i>	<i>nach 24 Stunden</i>	<i>3. Meßtag</i>
<i>CD8+/HLA-DR+ Zellen</i>	-50 (-66; -34)	+1 (-38; 38)	+4 (-36; +42)
<i>CD4+/CD45RA+ Zellen</i>	-107 (-146; -67)	57 (-24; +138)	-10 (-66; +46)

Auch die prozentualen Änderungen zeigen ein ähnliches Ergebnis. Jedoch liegen bei den CD8/HLA-DR Zellen die Konfidenzintervalle der 2. und 3. Messung zu hoch, um diese statistisch bewerten zu können.

Übersicht: Angaben in Prozent bzgl. des Ausgangswertes

	nach Apherese	nach 24 Stunden	3. Meßtag
CD8+/HLA-DR+ Zellen	-30	+16	+32
CD4+/CD45RA+ Zellen	-25	+17	-2

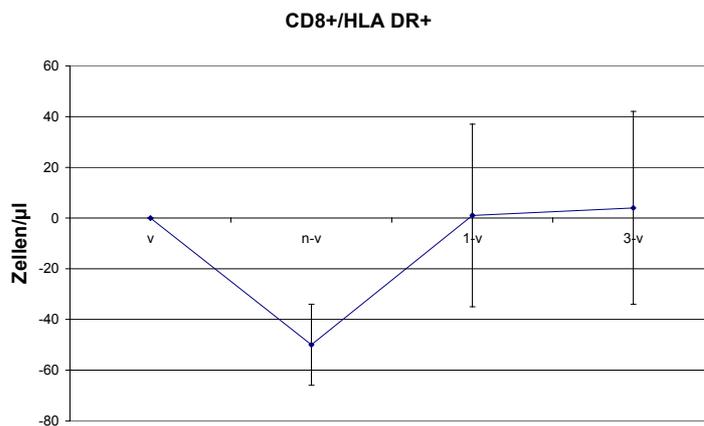


Abb.27: Mittelwerte der HLA-DR-positive T-Suppressorzellen/ μ l mit Konfidenzintervallen

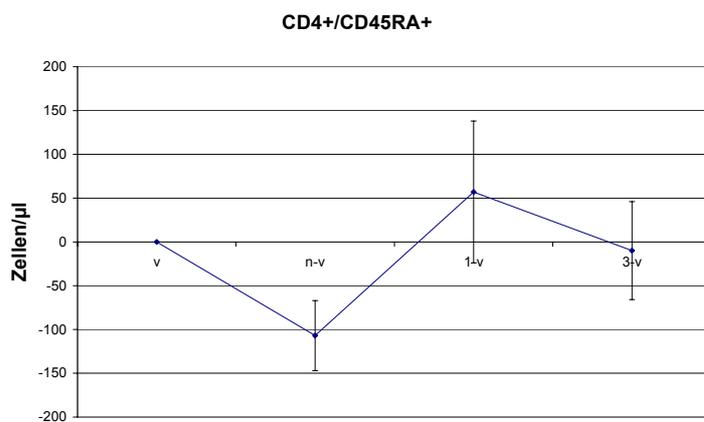


Abb.28: Mittelwerte der CD45RA-positive T-Helferzellen/ μ l mit Konfidenzintervallen

4.3 Funktionelle Veränderungen der Lymphozyten

Neben den quantitativen Zellverschiebungen wurde der Einfluß der Zytapherese auf die Funktion des zellulären Immunsystems untersucht. Hierbei wurde die intrazelluläre Zytokinproduktion von T-Zellen und NK-Zellen ermittelt. Um diese zu beschreiben, wird der prozentuale Anteil der jeweiligen Subpopulation angegeben, der nach Stimulation IFN- γ bzw. IL-2 Expression zeigt. Diese Werte sind tabellarisch im Anhang aufgelistet. Die weitere Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Form der statistisch bearbeiteten Daten (siehe 3.2.5).

Die Graphiken sind analog zu den Diagrammen aus dem Absatz 4.2.1. aufgebaut.

4.3.1 Zytokinproduktion der T-Helferzellen

4.3.1.1 Interferon- γ Produktion

Der Verlauf der Mittelwertkurve zeigt, daß zu jedem Meßzeitpunkt ein Anstieg an produzierenden Zellen vorliegt. Nach Apherese um 1,5%, nach 24 Stunden um 2,1% und am 3. Meßtag um 0,8%.

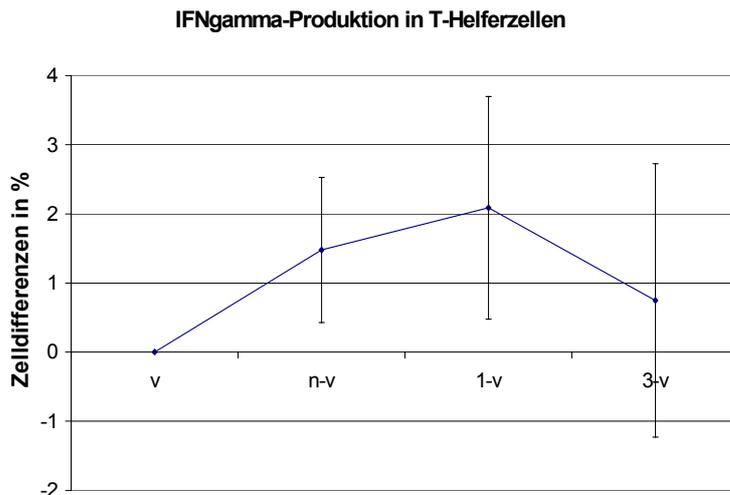


Abb.29: Mittelwerte der IFN- γ produzierenden T-Helferzellen mit Konfidenzintervallen

Betrachtet man die IFN- γ produzierenden Zellen als Grundgesamtheit ergeben sich folgende Veränderung: Gegenüber dem Ausgangswert konnte der Anti-IFN- γ -AK nach Apherese an 40% mehr Zellen binden, an 51% mehr Zellen am 1.Tag nach Apherese und an 29% mehr Zellen am 3.Messtag.

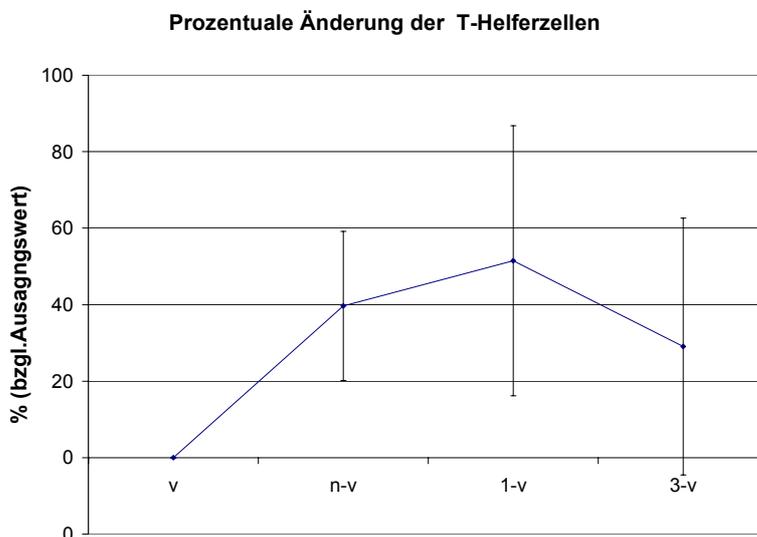


Abb.30: Mittelwerte der prozentualen Änderungen von IFN- γ produzierenden T-Helferzellen mit Konfidenzintervallen

4.3.1.2 Interleukin-2 Produktion

Der Anteil der Interleukin-2 produzierenden Zellen nimmt durch die Apherese ebenfalls zu: um 1,4% nach Apherese, um 2,8% nach 24 Stunden und um 1,3% am 3. Meßtag.

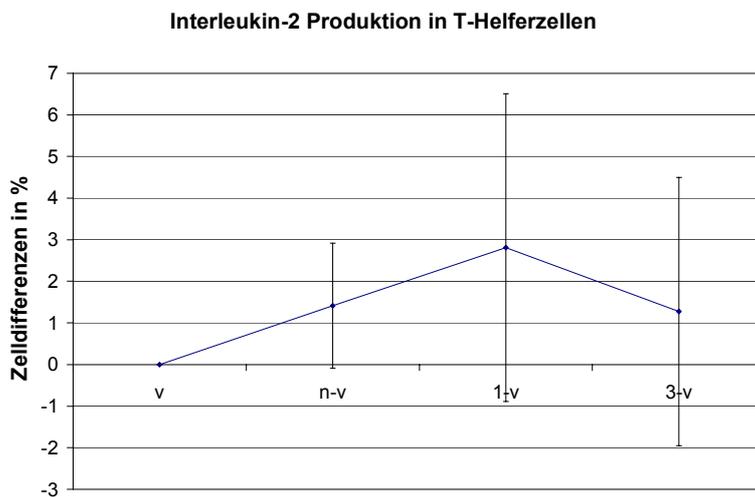


Abb 31: Mittelwerte der IL-2 produzierenden T-Helferzellen mit Konfidenzintervallen

Es produzieren 46% mehr Zellen als vor der Apherese Interleukin-2. Nach 24 Stunden sind es 110% und am 3. Meßtag 75% mehr.

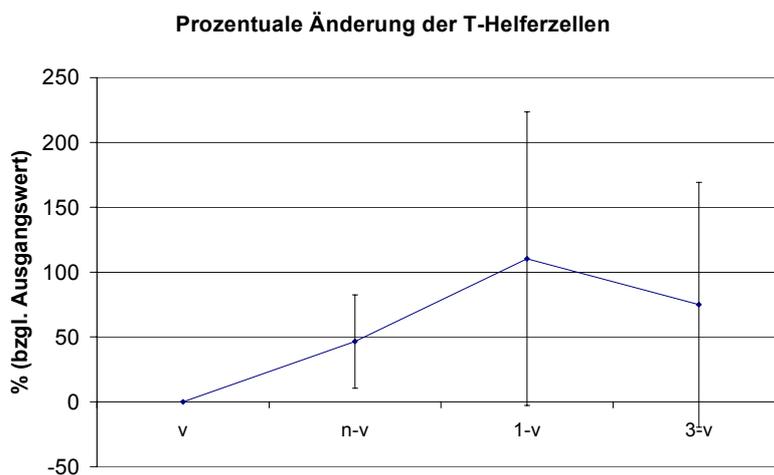


Abb.32: Mittelwerte der prozentualen Änderungen von IL-2 produzierenden T-Helferzellen mit Konfidenzintervallen

4.3.2 Interferon- γ Produktion der T-Suppressorzellen

Der Anteil von IFN- γ produzierenden T-Suppressorzellen nimmt während der Apherese um 1,9% zu. Am 1. Tag danach sind es 2,3% mehr und nach 3 - 6 Tagen 1,5% mehr Zellen, in denen Zytokine nachgewiesen werden konnten.

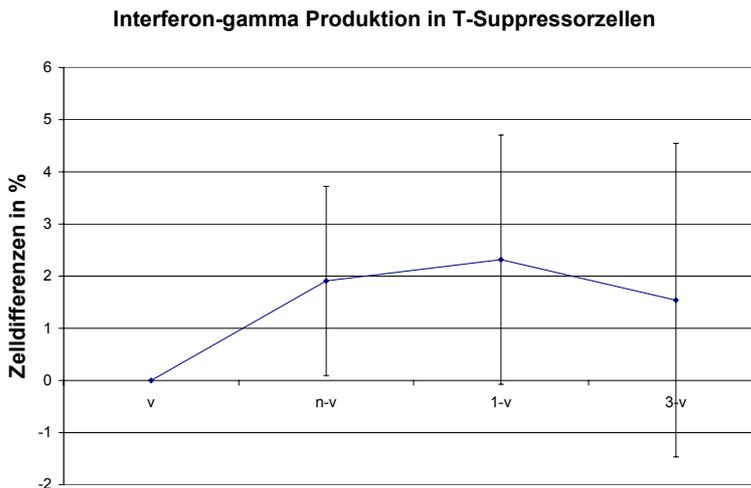


Abb.33: Mittelwerte der IFN- γ produzierenden T-Suppressorzellen mit Konfidenzintervallen

Die Veränderung der produzierenden Zellen beträgt nach Apherese 44%, nach 24 Stunden 56% und nach mehr als 72 Stunden 37%.

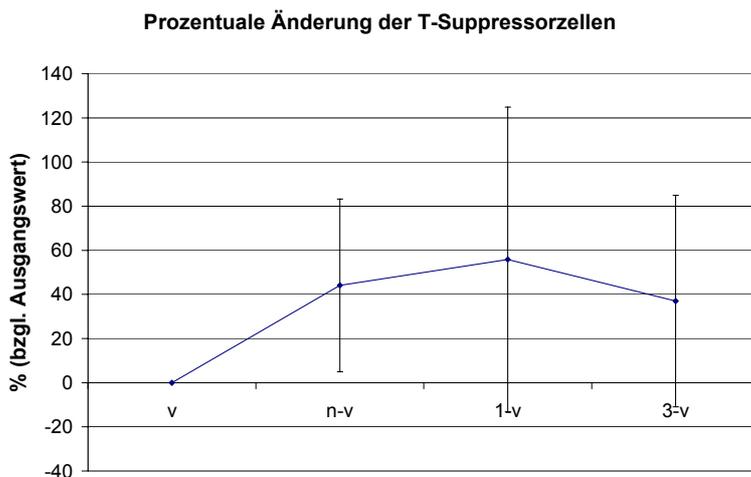


Abb.34: Mittelwerte der prozentualen Änderungen von IFN- γ produzierenden T-Suppressorzellen mit Konfidenzintervallen

4.3.3 Interferon- γ Produktion bei NK-Zellen

Bei den NK-Zellen läßt sich kaum eine Veränderung der INF- γ Produktion feststellen. Die Mittelwerte liegen nach Apherese bei -0,2%, am 1. Meßtag bei 0,7% und am 3. Meßtag bei -0,1%.

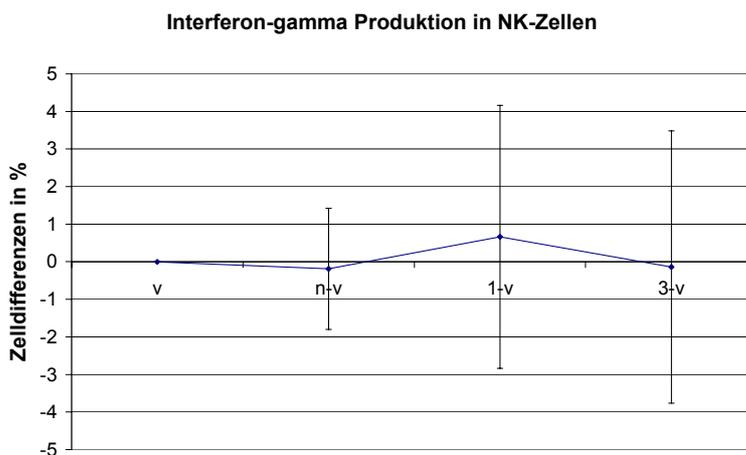


Abb.35: Mittelwerte der IFN- γ produzierenden NK-Zellen mit Konfidenzintervallen

Auf eine Darstellung der prozentualen Änderung der produzierenden Zellen wird aufgrund der geringen Unterschiede verzichtet.

4.3.4 Interferon- γ und Interleukin-2 Produktion bei T-Zellen

Bei der Bestimmung der Zytokinproduktion von T-Helfer- bzw. T-Suppressorzellen wurden auch die Veränderungen der CD3-positiven Zellen (gesamte T-Zellen) registriert. Hierbei ergaben sich analoge Werte zu den T-Helfer- bzw. T-Suppressorzellen, so daß sich eine graphische Darstellung erübrigt. Die Werte sind in der Übersichtstabelle unter 4.3.5 ersichtlich.

4.3.5 Übersichtstabellen zur intrazellulären Zytokinproduktion

INF- γ produzierende Zellen

(in % der Subpopulation; angegeben ist die Änderung zum Wert vor Apherese)

Subpopulation	nach Apherese	nach 24 Stunden	3. Meßtag
<i>T-Helferzellen</i>	1,5	2,1	0,8
<i>T-Suppressorzellen</i>	1,9	2,3	1,5
<i>NK-Zellen</i>	-0,2	0,7	-0,1
<i>T-Zellen</i>	1,4	2,2	1,0

Prozentuale Änderung bei INF- γ produzierenden Zellen

(in % bzgl. Ausgangswert)

Subpopulation	nach Apherese	nach 24 Stunden	3. Meßtag
<i>T-Helferzellen</i>	40	52	29
<i>T-Suppressorzellen</i>	44	56	37
<i>T-Zellen</i>	39	62	38

Veränderung bei IL-2 produzierenden T-Helferzellen

(Einheiten der Angaben siehe oben)

Subpopulation	nach Apherese	nach 24 Stunden	3. Meßtag
<i>produzierende Zellen</i>	1,4	2,8	1,3
<i>prozentuale Änderung</i>	46	110	75

5. Diskussion

5.1 Wertigkeit der Veränderung im Immunsystem durch eine Zytapherese

5.1.1 Leukozytenzahlen

Leukozyten, die in der Routinediagnostik primär als Entzündungsparameter dienen, wurden in der Studie quantitativ erfaßt. Die Gesamtleukozytenzahl sollte bei Erwachsenen zwischen 4000/ μl und 11000/ μl liegen [29]. Mit Ausnahme von 5 Messungen liegen alle Werte in diesem Bereich. Ein Proband wies durchgehend erhöhte Leukozytenzahlen auf. Dies war bereits aus Voruntersuchungen bekannt. Der Grund ist hier möglicherweise ein starker Nikotinkonsum, der eine häufige Ursache für leichte Leukozytosen ist [30]. Da ein einmalig über 11000/ μl liegender Wert noch keine Krankheit signalisiert, dürfte auch bei dem zweiten betroffenen Probanden keine eindeutige Pathologie des weißen Blutbildes vorliegen. Kausal dafür war eine Erhöhung der Granulozyten, die den Grenzwert von 8500/ μl überschritten. Sowohl Lymphozyten als auch Monozyten lagen im Normbereich.

Verursacht die Apherese keine massiven Leukozytenverschiebungen im Sinne einer Leukozytose, so gibt es doch meßbare, signifikante Veränderungen.

Die signifikante Abnahme der Leukozyten nach Apherese zeigt, daß die gewünschten Zellen aus dem Blut entfernt wurden, nämlich überwiegend Lymphozyten und Monozyten, während die neutrophilen Granulozyten anstiegen.

Der Vergleich zu der Studie von Bryant et al., in der die Veränderungen im weißen Blutbild nach einer 450 ml-Vollblutspende an 12 Probanden untersucht wurde, zeigt, daß der Abfall der Leukozyten in unserer Untersuchung geringer ist (475 zu 667/ μl). Durch die Apherese gehen, wie zu erwarten, mehr Lymphozyten verloren (587 zu 292/ μl), aber die Absolutzahl der neutrophilen Granulozyten steigt um 174/ μl an; bei der Vollblutspende sinken die Neutrophilen um 233/ μl [31]. Das maschinelle Umwälzen des Blutes scheint Granulozyten zu mobilisieren, der reine Aderlaß dagegen verursacht dies nicht.

Einige Ursachen sind bekannt, die zur Erhöhung von neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut führen. So können körperliche Aktivitäten und Traumen, Infektionen oder entzündliche Erkrankungen zu Grunde liegen. Auch die Blutung ist eine häufige Ursache [32]. Da die Apherese mit einem akuten "Blutverlust" vergleichbar ist, könnten ähnliche Mechanismen, die bei Blutungen eine Rolle spielen, am Granulozytenanstieg beteiligt sein. Mögliche Einflußfaktoren sind auch der Kontakt mit Fremdoberflächen, der über Adhäsionsmoleküle eine Aktivierung diverser Leukozyten auslöst, Veränderungen der Rheologie (z.B. Strömungsturbulenzen) und Beeinflussung der Hämostase durch die Antikoagulation. Auffällig ist, daß nicht nur unmittelbar nach Apherese, sondern auch 3 Tage später diese Erhöhung nachweisbar ist. Folglich scheinen nicht nur kurzfristig mehr Zellen aus dem Marginalpool und der Knochenmarksreserve in die Zirkulation ausgeschwemmt zu werden, sondern es ist auch die Granulozytenproduktion offenbar gesteigert. Dies könnte Ausdruck der Aktivierung von lymphozytären und monozytären Zellen sein, die durch erhöhte Zytokinexpression eine Steigerung der Granulopoese bewirken [33].

Die Apherese ist scheinbar ein Trigger, der groß genug ist, um neutrophile Granulozyten für mindestens eine Woche zu mobilisieren. Unklar bleibt, ob sich dieser Effekt nach wiederholter Apherese zeigt oder sich eine Adaptation einstellt. Konnten doch Lange et al. in einer Studie an Vollblutspendern mit mehr als 10 Spenden in einem Zeitraum von 48 Monaten und an Thrombozytenspendern, die mindestens 10mal in 2 Jahren apheresiert worden waren, zeigen, daß die Granulozytenzahl im Vergleich zu Voruntersuchungen signifikant absinkt [34].

Haben die Monozyten bereits 24 Stunden nach der Apherese wieder den Ausgangswert erreicht, liegen die Lymphozyten am Postapheresetag nicht signifikant, aber deutlich über dem Ausgangswert. Reaktive Lymphozytosen sind in erster Linie im Rahmen bestimmter Infektionen bekannt, bei denen virale oder bakterielle Antigene eine humorale oder zytotoxische Immunantwort auslösen. Auch wenn der Lymphozytenanstieg keine pathologischen Dimensionen erreicht, kann man spekulieren, daß der Blutkontakt mit einer Fremdoberfläche zu einer mäßigen Antigenreaktion führt. Auch die Einschwemmung kleinster Partikel in die Zirkulation könnten dafür ursächlich sein. Es scheint sich nur um einen kurzfristigen Effekt zu handeln, denn bereits nach 3 Tagen liegen die Werte wieder im Bereich des Ausgangswertes. Anderlini et

al. beschreiben auch transiente Lymphozytopenien nach Stammzellapherese, die aber asymptomatisch und selbstlimitierend verliefen [35].

In der bereits oben erwähnten Studie von Lange et al. zeigt sich bei längerfristiger Thrombozyten- bzw. Vollblutspende ein Lymphozytenabfall. Bei Absammlung in kurzen Intervallen scheint der Körper den Verlust nicht mehr ausgleichen zu können, was nach einmaliger Apherese noch gelingen kann.

5.1.2 Lymphozytensubpopulationen

Santagostino et al. führten 1999 eine multizentrische Studie durch, um Referenzwerte für Lymphozytensubpopulationen zu definieren. Als Mittelwert für die T-Helferzellen ermittelte er 940/ μ l. Wir wiesen vor Apherese im Schnitt 980/ μ l T-Helferzellen nach. Bei den T-Suppressorzellen liegt der Referenzwert bei 551/ μ l; unser Mittelwert lag vor der Blutspende bei 623/ μ l. Der Normalwert der B-Zellen wird mit 231/ μ l angegeben; 273/ μ l war unser Durchschnittswert vor Apherese. Bei den NK-Zellen liegt die Norm bei 278/ μ l; wir wiesen 302/ μ l vor Absammlung nach [36]. Damit scheinen unsere Messungen im Bereich einer tolerablen Schwankungsbreite zu liegen und Ausdruck eines gesunden Spendergutes zu sein.

Bei den einzelnen Lymphozytensubpopulationen zeigen sich zwei verschiedene Verlaufsmuster: Die Schwankungen der B-, T-Helfer- und T-Suppressorzellzahlen verhalten sich analog, während die Veränderungen der NK-Zellzahlen davon abweichen. Erstere fallen unmittelbar nach Apherese ab, zeigen einen deutlichen, aber nicht signifikanten Anstieg 24 Stunden später und weisen am 3. Tag den Ausgangswert auf. NK-Zellen hingegen erreichen nach dem Abfall durch die Apherese auch 24 Stunden später ihren Ausgangswert nicht. Sie sinken am 3. Tag wieder ab und liegen signifikant unter dem Wert vor Apherese. Der tendenzielle Verlauf im Beobachtungszeitraum ist also identisch. Da durch die Apherese relativ mehr NK-Zellen als Lymphozyten abgesammelt werden, scheint der Körper den Verlust nicht in gleichem Maße kompensieren zu können. Ursächlich könnte die geringere Speicherung oder die kürzere Lebenszeit der Zellen sein.

Ähnliche Studien untersuchen stets die Auswirkung an Spendern, die G-CSF zur Mobilisierung der Stammzellen erhalten haben. So wiesen Martinez et al. an 20 zytokinstimulierten Probanden nach, daß 7 Tage nach der Apherese eine Lymphozyto-

penie besteht, die T-Helfer-, T-Suppressor- und B-Zellen betrifft. Binnen der weiteren 2 Messungen (nach 1 und 3 Monaten) bildete sich diese zurück. Die NK-Zellen zeigten diesen Abfall nicht [37]. Die Apherese nach Zytokinstimulation hat folglich andere Auswirkungen als die reine Apherese, aus der kurzfristig ein Defizit an NK-Zellen resultiert. Möglicherweise werden die Knochenmarkreserven für die Lymphozyten durch die G-CSF Gabe in höherem Maße erschöpft, als die der NK-Zellen. Langzeitfolgen konnten in einer Untersuchung an Spendern 1 Jahr nach Apherese ausgeschlossen werden [38].

Im Vergleich zur Vollblutspende sinken die Lymphozytenzahlen wie zu erwarten deutlicher. Werden den Blutspendern nur 7% der T-Helferzellen entzogen, verliert der Apheresespende 19%. Der Verlust an T-Suppressorzellen beträgt bei der Blutspende 19%, bei der Apherese 25%. 12% der B-Zellen werden durch Vollblutspende abgesammelt, bei der Apherese 15%. Das Defizit der NK-Zellen beträgt 41% zu 48% beim Vergleich Vollblutspende zur Apherese [39].

Das Defizit an T-Helferzellen (CD3+CD4+) ist beim Apheresespende wesentlich ausgeprägter. Hierzu wurden bisher keine Daten erhoben. Vergleichszahlen liegen nur für Dauervollblutspende (mindestens 10 Spenden) vor. Diese weisen nach der Spende ein signifikantes Defizit an NK-Zellen und T-Suppressorzellen auf: Die NK-Zellen sinken um 52%, die T-Suppressorzellen um 32% [40].

Untersuchungen an Thrombozytenspendern wurden nur in Langzeitstudien durchgeführt. Die Ergebnisse sind konträr: Lange et al. sprechen in ihrer Studie von signifikanten Verlusten der NK- und T-Suppressorzellen (34% bzw. 26%) [41]. Carrero et al. fanden keine Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen [42].

Zotti et al. führten eine Analyse der Lymphozytensubpopulationen bei Lungentransplantierten durch, um etwaige Veränderungen in klinischen Situationen aufzudecken. So wiesen Patienten mit postoperativen Infektionen ein Defizit von 42% bei NK-Zellen und T-Suppressorzellen sowie 7% bei T-Helferzellen auf [43]. Die Apherese mindert die entsprechenden Zellen um 48%, 25% und 19%. Eine Untersuchung an nicht Immunsupprimierten, die an Infektionen leiden, wäre wünschenswert, um auch die Absolutzahlen vergleichen zu können. So könnte man die Vermutung bestätigen oder verwerfen, der Immunstatus nach Apherese entspräche dem einer Infektion.

Die Untersuchung der CD45RA⁺ T-Helferzellen sollte prüfen, ob die Apherese Einfluß auf den Pool der naiven T-Zellen hat. Bei CVID-Patienten ist gerade das Defizit dieser Population bekannt [44]. Wir konnten im Verlauf der Untersuchung keinen Unterschied zu den gesamten CD4⁺ Zellen aufzeigen.

Die CD8⁺/HLA-DR⁺ Zellen sind aktivierte T-Suppressorzellen. Die Beurteilung der Auswirkungen der Apherese auf diese Zellpopulation fällt schwer. Die interindividuellen Unterschiede sind zu groß, um eine statistische Aussage zu treffen. Der Anteil aktivierter T-Suppressorzellen korreliert nicht mit dem Verlauf der CD8⁺ Zellzahl.

5.1.3 Zytokinproduktion

Wir untersuchten in unserer Studie die IFN- γ Produktion von T-Helferzellen, T-Suppressorzellen und NK-Zellen sowie die IL-2 Produktion von T-Helferzellen.

Es konnte gezeigt werden, daß die IFN- γ Produktion von T-Helfer- und T-Suppressorzellen unmittelbar nach Apherese und 24 Stunden später gegenüber dem Ausgangswert signifikant anstieg, während die NK-Zellen kaum Veränderungen zeigten.

IFN- γ steigert vor allem die Phagozytose, Bakterizidie und die Funktion als antigenpräsentierende Zellen von Monozyten und Makrophagen; durch eine gesteigerte Expression der MHC-Moleküle der Klasse I und II werden die Funktionen der T-Helfer- und T-Suppressorzellen verändert. Die NK-Zellen werden in ihrer zytotoxischen Funktion verstärkt [45].

Andere Studien, die den Einfluß der Apherese auf die Zytokinexpression untersuchen, liegen bisher nicht vor. North et al. untersuchten die Unterschiede der IFN- γ Produktion der CD4-positiven und CD8-positiven Zellen bei CVID-Patienten im Vergleich zu einer Normalpopulation. Sie konnten zeigen, daß signifikant mehr Zellen von CVID-Patienten, sowohl T-Helfer- wie T-Suppressorzellen, IFN- γ produzieren [46]. Dies bestätigte sich für die T-Suppressorzellen auch in einer weiteren Arbeit [47]. North wertet das erhöhte IFN- γ , das als proinflammatorisches Zytokin bekannt ist, als Zeichen eines entzündlichen Geschehens und einer überaktiven Th1-Antwort. IFN- γ gilt zudem als einer der wichtigsten Makrophagenaktivatoren [48].

Die Apherese könnte also einen Stimulus bedeuten, der dem eines entzündlichen Geschehens vergleichbar ist und eine Aktivierung der T-Lymphozyten hervorruft.

IFN- γ spielt vor allem auch bei der GvHD eine entscheidende Rolle. In der Effektor-

phase der Reaktion scheint es der oder doch einer der entscheidenden Modulatoren zu sein. Transfusion von Nabelschnurblut führt wesentlich seltener zu einer GvHD als die Übertragung von adulten Blutzellen; die genaue Untersuchung des Zytokinprofils dieser Zellen ergab, daß Lymphozyten aus Nabelschnurblut signifikant weniger IFN- γ nach Stimulation produzieren als Zellen eines Erwachsenen [49]. Somit scheint die Zytokinproduktion auch Ausdruck eines voll funktionsfähigen Immunsystems zu sein. Han and Hodge werfen sogar die Frage auf, ob die immunologischen Kompetenz nach einer Transfusion von Nabelschnurblut gewährleistet ist. Die Apherese greift in das System der Lymphozyten folglich nicht schwächend, sondern aktivierend ein. Die funktionsfähige Immunabwehr scheint bei gesunden Spendern erhalten zu bleiben.

Während T-Zellen durch die Apherese zu einer gesteigerten Interleukinproduktion angeregt werden, zeigen die NK-Zellen keinen signifikanten Unterschied in der IFN- γ Produktion. Das Fehlen einer Reaktion könnte man zum einen in der Hinsicht werten, daß das NK-Zellsystem von der Apherese unbeeinflusst bleibt. Die fallende Absolutzahl der NK-Zellen und die deutliche Reaktion der T-Zellen legen zum anderen die Überlegung nahe, die fehlende Stimulierbarkeit als eine Funktionseinschränkung zu werten.

Über die NK-Zellaktivität gibt es einige Untersuchungen, die nicht Zytokine bestimmen, sondern einen 51Cr-release assay durchführen, um die Funktion zu bewerten. Eine eingeschränkte NK-Zellaktivität ist als Folge der Bluttransfusion bekannt [50].

Heiss et al. konnten darüber hinaus zeigen, daß ein allogenes Blutprodukt die Aktivität stärker unterdrückt als ein autologes. Sie wiesen auch eine Reduktion der NK-Zellaktivität beim Spender nach [51]. Blutverlust im Sinne einer Blutspende beeinträchtigt die Funktion der NK-Zellen. Gleiches scheint für die Apherese zu gelten.

Analog zu den T-Zellen zeigen auch die NK-Zellen des Nabelschnurblutes eine wesentlich geringer ausgeprägte IFN- γ Produktion als die Zellen Erwachsener, so daß auch hier das IFN- γ als Marker eines reifen, intakten Immunsystems gelten kann [52]. (Ein Vergleich der Absolutzahlen scheint nicht sinnvoll, da sowohl in dieser wie auch in den oben erwähnten Studien unterschiedliche Mengen PMA und Ionomycin zur Stimulation eingesetzt wurden.)

Das Ausbleiben der gesteigerten Zytokinproduktion nach der Apherese scheint in Anbetracht der übrigen Ergebnisse eher als ein durch die Apherese verursachtes Funktionsdefizit gewertet werden zu können.

Taga et al. nennen in ihrer Studie Granulozyten als Faktor der unterdrückten NK-Zellaktivität bei Patienten mit aplastischer Anämie [53]. Könnte die gestiegene Granulozytenzahl nach der Apherese auch am Ausbleiben des Anstiegs der IFN- γ Produktion von NK-Zellen ursächlich beteiligt sein?

Die IL-2 Produktion von T-Helferzellen verhält sich analog zu der IFN- γ Produktion; sie steigt nach Apherese signifikant an und erreicht ihr Maximum nach 24 Stunden. Interleukin-2 ist ein wichtiges Zytokin, das T-, B- und NK-Zellen zu Wachstum stimuliert [54]. Auch eine gesteigerte NK-Zellaktivität und zytolytische Aktivität der zytotoxischen T-Lymphozyten wird durch IL-2 beobachtet.

Es spielt in der Diskussion um die Modulation der GvHD neben dem IFN- γ eine wesentliche Rolle. Auch hier produzieren die vermeintlich häufiger GvHD auslösenden Zellen Erwachsener mehr IL-2 [55]. Die Produktion von IL-2 scheint für eine effektive Immunantwort essentiell zu sein. CD4⁺ Zellen von HIV-Positiven produzieren nach Westby et al. signifikant weniger IL-2 [56]. Wie schon in der Untersuchung der IFN- γ Produktion zeigt sich auch hier kein schwerwiegender Eingriff in das Immunsystem oder gar ein Verlust der Immuninkompetenz.

Das parallele Verlaufsmuster von IL-2 und IFN- γ spiegelt eine Th1-Helferzellaktivierung wider. Die bereits oben erwähnte Vorstellung, die Apherese führe zu einem entzündungsähnlichen Zustand unmittelbar nach der Apherese, wird damit unterstützt. Stellen doch die IL-2 und IFN- γ produzierenden Th1-Helferzellen die Gruppe der inflammatorisch wirksamen T-Helferzellen dar.

5.2 Mögliche Auswirkungen auf den Spender

5.2.1 Zelluläre Verschiebung

Die Einschätzung der klinischen Relevanz der zellulären Veränderungen durch die Apherese fällt schwer. Lange et al., die vergleichbare Schwankungen im weißen Blutbild bei Vollblutspendern und Thrombozytenspendern untersucht haben, lassen die daraus resultierenden Folgen undiskutiert und sprechen von einer noch zu klärenden klinischen Relevanz [57]. Auch Martinez et al. äußern keine denkbaren klinischen Auswirkungen der von ihnen an 20 mit G-CSF stimulierten Spendern nach der Apherese festgestellten Lymphozytopenie [58].

Am ehesten klinisch relevant könnte die sich unmittelbar nach der Apherese bietende Situation sein: eine Verminderung der Lymphozyten - und aller gemessenen Subpopulationen - sowie die milde Erhöhung der Granulozyten. Rein quantitativ erinnert diese Konstellation an den Beginn einer Entzündung. Qualitativ sind die Veränderungen mutmaßlich zu gering, als daß tatsächlich Symptome zu erwarten wären. So beschreiben Byrant et al. z.B. in ihrer Studie an Vollblutspendern das Auftreten von Krankheiten erst bei Probanden, deren T-Helferzellzahl unter $300/\mu\text{l}$ liegen [59]. Derart deutliche Veränderungen wurden in unserer Untersuchung bei keinem Probanden gemessen.

Anderlini et al. sprechen in ihrem in *Blood* erschienen Artikel „Allogenic Blood Stem Cell Transplantation: Considerations for Donors“ sogar davon, daß die beobachteten postapherisären Zytopenien generell asymptomatisch und selbst limitierend seien [60]. Sie schließen somit jegliche gesundheitliche Folgen für den Spender aus.

Wir konnten zeigen, daß die Verluste an B-, T-Helfer- und T-Suppressorzellen bereits nach 24 Stunden überschießend kompensiert sind; dies unterstützt Anderlinis Postulat von der unbedenklichen postapherisären Zytopenie. Ob jedoch der in unserer Studie gezeigte Verlust an NK-Zellen, der auch am 3. Postaphersetag noch signifikant ist, keine Bedeutung hat, kann bezweifelt werden. Biron et al. beschreiben die wesentliche Bedeutung der NK-Zellen in der ersten Abwehr von viralen Infektionen [61]. Auch an der antibakteriellen Wirkung der NK-Zellen besteht kein Zweifel. Heiss et al. beschreiben die Funktion als wichtigen Baustein der Infekt-

kontrolle [62]. So erscheint die unspezifische Abwehr durch die Minderung der NK-Zellen geschwächt. Die klinische Relevanz ist jedoch unklar.

5.2.2 Veränderte Funktion von T- und NK-Zellen

Untersuchungen über den Einfluß einer Zytapherese auf die T- und NK-Zellfunktion gibt es bisher nicht. Der Anstieg der IFN- γ und IL-2 Produktion der T-Zellen durch die Apherese stellt eine Form der Aktivierung dar. Das Immunsystem reagiert darauf mit einer Th1 gewichteten Antwort. Die T-Zellen bleiben also funktionsfähig und erscheinen sogar aktiviert. Ob die gesteigerte Zytokinproduktion der einzelnen Zelle das quantitative Defizit ausgleichen kann, bleibt spekulativ. Am Tag 1 nach der Apherese besteht eine Aktivierungssteigerung im T-Zellsystem, da die Zellzahl und die IFN- γ bzw. IL-2 Produktion zugenommen haben.

Bedeutungsvoller könnte das Ausbleiben der IFN- γ Produktion der NK-Zellen sein. Da, wie oben beschrieben, die NK-Zellen wesentlich an der Abwehr von viralen oder bakteriellen Infektionen beteiligt sind, ist eine erhöhte Infektanfälligkeit nach der Apherese möglich, zumal die NK-Zellen qualitativ und quantitativ vermindert sind.

Neben ihrer antiinfektiven Funktion spielen die NK-Zellen auch in der Abwehr maligner Zellen eine Rolle. Blumberg und Hael zeigten in einer Metaanalyse, daß die 5-Jahres-Überlebens-Wahrscheinlichkeit von Patienten, die an einem Kolorektalkarzinom erkrankt waren, damit korreliert, ob vorher eine NK-Zellsupprimierung durch Bluttransfusion stattgefunden hat oder nicht: das Überleben lag bei 52 % von nicht Transfundierten und bei 31 % von Transfundierten [63]. Die NK-Zellen gelten somit als protektiv gegen das Auftreten von Metastasen. Auch bei der Abwehr von Leukämiezellen sind sie beteiligt [64].

Unter diesen Gesichtspunkten könnte durch die Schwächung des NK-Zellsystems die Apherese möglicherweise Bedeutung für die Gesundheit des Spenders, insbesondere eines autologen Stammzellspenders mit maligner Erkrankung, haben. Die klinische Bedeutung der NK-Zelldepletion sollte weiter untersucht werden.

5.3 Einfluß auf die Anwendung der Apherese

Betrachtet man die zellulären und funktionalen Veränderungen durch die Apherese zeigt sich im T-Zellsystem, einem Teil des spezifischen Immunsystems, eine Schwankung der Zellzahlen, die bereits am 3. Tag nach der Apherese wieder im Ausgangsbereich liegen. Die geringe Aktivierung dürfte keine weiter reichenderen Konsequenzen für den Probanden haben. Somit ist auch die generelle Empfehlung (Richtlinien der DGTI zur Stammzellapherese) einer einfachen Blutkontrolle direkt nach der Apherese gerechtfertigt.

Leicht konträr erscheint die Situation im NK-Zellsystem - einem Bestandteil des unspezifischen Immunsystems -, denn hier reicht ein Beobachtungszeitraum von 3 Tagen nicht aus, um ein Erreichen des Ausgangswertes festzustellen.

Da eine klinische Relevanz denkbar ist, wäre eine weiterführende klinische Untersuchung dieser Ergebnisse notwendig. So bleibt die postapherisäre NK-Zellzahl nach mehr als 3 Tagen zu kontrollieren und der Zusammenhang zwischen anhaltender NK-Zellsuppression und einer Infektneigung zu klären.

Neben den rheologischen Veränderungen rechtfertigen diese Ergebnisse das Anraten einer körperlichen Schonung nach der Apherese. Weitreichendere Maßnahmen wie Antibiotikaprophylaxe sind anhand der Datenlage nicht gerechtfertigt.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die kurzfristigen Einflüsse der Leukapherese auf das zelluläre Immunsystem des Spenders untersucht. Dafür wurden die Leukozytensubpopulationen quantitativ bestimmt. Des Weiteren wurde die Interferon- γ und Interleukin-2 Produktion der T-Zellen und die Interferon- γ Produktion von NK-Zellen untersucht.

24 gesunde Spender wurden mit dem MNC-Programm am Cobe Spectra Gerät apherisiert, wobei das zweifache Blutvolumen prozessiert wurde. Die Blutabnahmen erfolgten vor und unmittelbar nach Apherese, sowie 24 und 72 Stunden nach Apherese.

Die Bestimmung der Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten, bzw. derer Subpopulationen (T-Helfer-, T-Suppressor-, B- und NK-Zellen) erfolgte durchflußzytometrisch.

Die Zytokinproduktion von T- und NK-Zellen wurde nach Dichtezentrifugation und 5stündiger Kultivierung der mononukleären Zellen, die zuvor mit PMA und Ionomycin stimuliert wurden, ebenfalls durchflußzytometrisch detektiert.

Es konnte für die Leukozyten ein Verlust von $475/\mu\text{l}$ durch die Apherese gezeigt werden, der durch eine Abnahme an Monozyten und Lymphozyten verursacht war. Die Monozyten erreichten ihr Ausgangsniveau bereits 24 Stunden später, während die Lymphozyten nach einer überschießenden Kompensation am 1. Tag (Zuwachs von $183/\mu\text{l}$) am 3. Tag auf den Anfangswert fielen. Die nach 72 Stunden erhöhte Leukozytenzahl (plus $533/\mu\text{l}$) erklärte sich aus der deutlichen Mobilisierung der zirkulierenden Granulozyten. Die Lymphozytensubpopulationen spiegelten mit Ausnahme der NK-Zellen den Verlauf der Gesamtlymphozyten wider. Die NK-Zellen zeigten eine deutliche Abnahme in der Quantität (48% im Vergleich zum Anfangswert), die auch nach 72 Stunden nicht ausgeglichen wurde.

Sowohl die Interferon- γ Produktion als auch die Interleukin-2 Produktion der T-Zellen war nach der Apherese erhöht. Die Interferon- γ Produktion der NK-Zellen hingegen blieb nahezu unverändert.

Sowohl die durch die Apherese hervorgerufene Erhöhung der Granulozyten, B- und T-Lymphozyten als auch die gesteigerte Zytokinproduktion der T-Zellen können als Stimulierung des Immunsystems bewertet werden. Hingegen erscheint die Interferon- γ Produktion der NK-Zellen nach der Apherese unbeeinflusst. Ihre zirkulierende Zahl sinkt und wird auch nach 3 Tagen nicht kompensiert.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann man divergierende Effekte einer Leukapherese auf das spezifische und unspezifische zelluläre Immunsystem vermuten. Die klinischen Auswirkungen bedürfen weiterer Klärung.

7. Anhang

7.1. Zellzahlen

(Angaben in Zellen/ μ l)

Leukozyten:

Patientennr.	vorher	nachher	24 h	3-6 d
1	5400	5200	5800	5400
2	6300	7100	7800	7100
3	5900	5600	4900	5900
4	8800	6800	9200	9200
5	7300	8200	7700	7900
6	5200	4400	6200	7100
7	9600	8300	10300	10900
8	3800	4800	5200	6100
9	5900	5300	4500	5500
10	5200	4800	5700	7400
11	5700	6500	6200	7100
12	6700	4600	6100	6500
13	7600	9200	8700	7300
14	6800	4700	6800	6800
15	8400	6300	9000	6300
16	6100	6800	7500	7300
17	6900	5700	7300	8500
18	9500	9700	10800	10100
19	6800	5900	5700	6800
20	13500	12500	12900	11200
21	9400	8700	11000	12900
22	4500	4000	5000	5000
23	6400	5900	5700	6400
24	6600	5900	4800	6400

Granulozyten:

Patientennr.	vorher	nachher	24 h	3-6 d
1	2268	2756	3016	2700
2	4410	5396	6084	5041
3	3658	4312	3136	4130
4	5208	3906	5760	4221
5	5456	5032	5520	5796
6	4088	5084	3619	5688
7	3380	2948	3844	4970
8	6336	6474	7828	7739
9	2926	3840	3328	4758
10	3481	3180	2475	3630
11	3380	3600	2793	4958
12	3249	4290	3906	4757
13	3886	3404	3477	3640
14	4864	6072	5307	5037
15	3808	2867	4216	3536
16	4026	5168	5325	5183
17	4278	3990	4599	6120
18	6555	7566	6804	6868
19	3060	3894	3420	4556
20	10260	9625	10320	8176
21	6862	6525	6930	8772
22	2475	2760	2750	2900
23	4544	4307	3876	4224
24	3960	3599	2544	3776

Monozyten:

Patientennr.	vorher	nachher	24 h	3-6 d
1	216	156	174	270
2	441	284	390	426
3	354	224	245	295
4	588	504	630	441
5	440	272	460	460
6	438	492	462	553
7	312	308	434	426
8	768	498	515	654
9	190	240	312	305
10	472	424	360	330
11	260	144	342	296
12	171	260	248	213
13	469	230	366	390
14	532	736	696	730

15	476	282	476	612
16	366	408	450	438
17	483	399	584	425
18	475	291	540	505
19	476	354	285	272
20	675	625	516	560
21	470	348	550	516
22	225	80	250	200
23	320	118	285	256
24	396	354	384	384

Lymphozyten:

Patientennr.	vorher	nachher	24 h	3-6 d
1	2920	2280	2610	2380
2	1510	1420	1330	1630
3	1890	1000	1470	1420
4	2640	2040	2670	2484
5	2410	1800	2700	2530
6	1980	1410	4660	1490
7	2690	2160	3300	2620
8	1030	770	940	1400
9	1060	850	1350	940
10	1720	1540	2170	2000
11	1710	1430	2790	2060
12	2680	1380	2010	1890
13	2660	1930	3220	2770
14	1970	1220	2110	1430
15	3110	2080	2880	2460
16	1710	1230	1730	1750
17	2140	1310	2120	1870
18	2570	1840	3350	2730
19	3200	1710	2000	1900
20	2570	2250	1940	2460
21	2160	1740	3520	3610
22	1800	1120	2000	1900
23	1410	1180	1370	1730
24	2180	1950	1870	2240

B-Zellen:

Patientennr.	vorher	nachher	24 h	3-6 d
1	292	296	287	262
2	181	170	160	212
3	208	150	221	227
4	396	367	427	422
5	289	270	378	354
6	297	268	746	164
7	350	367	396	445
8	103	85	103	182
9	127	119	189	132
10	206	185	304	180
11	171	172	279	247
12	348	193	281	265
13	319	290	419	360
14	374	256	443	329
15	404	312	346	271
16	120	123	156	193
17	235	197	212	318
18	308	276	469	328
19	288	137	180	133
20	411	383	272	344
21	324	278	493	469
22	216	123	260	228
23	226	212	192	294
24	371	332	281	358

T-Helferzellen:

Patientennr.	vorher	nachher	24 h	3-6 d
1	1520	1240	1280	1360
2	710	690	610	620
3	710	690	610	620
4	1140	920	1140	1240
5	915	740	1160	1138
6	770	660	2000	540
7	1130	1020	1420	1310
8	450	380	460	660
9	510	410	590	460
10	810	750	1110	840
11	800	820	1310	1110
12	1100	610	870	750
13	1040	930	1480	1250
14	970	640	970	630

15	1680	1080	1560	1400
16	750	660	880	950
17	1130	760	1020	1010
18	1410	1120	1810	1390
19	1470	700	940	820
20	1230	1060	850	1080
21	1230	910	1870	1840
22	700	410	760	680
23	520	540	550	740
24	830	700	600	800

T-Suppressorzellen:

Patientennr.	vorher	nachher	24 h	3-6 d
1	670	570	630	570
2	450	470	410	370
3	490	320	490	400
4	740	470	710	680
5	770	630	860	780
6	610	390	1490	450
7	670	520	890	730
8	230	160	230	340
9	220	180	300	200
10	580	460	630	600
11	500	370	610	600
12	860	470	640	620
13	850	700	900	780
14	510	330	490	310
15	1150	690	980	790
16	560	470	550	540
17	676	340	780	540
18	510	410	740	650
19	960	650	620	630
20	720	630	520	670
21	520	510	1020	1010
22	650	370	760	680
23	320	280	340	420
24	740	680	670	810

NK-Zellen:

Patientenr.	vorher	nachher	24 h	3-6 d
1	380	160	310	240
2	170	140	120	100
3	510	150	180	240
4	400	220	320	200
5	360	180	430	250
6	340	110	480	340
7	540	240	560	310
8	170	90	120	170
9	260	140	310	160
10	310	230	220	560
11	340	170	670	230
12	380	150	200	270
13	430	160	320	310
14	220	60	230	200
15	340	170	290	300
16	360	160	210	180
17	130	50	150	60
18	280	70	340	330
19	420	210	220	290
20	210	140	250	320
21	90	90	210	250
22	290	240	360	290
23	170	80	120	160
24	170	140	210	200

CD8/HLA-DR positive Zellen:

Patientenr.	vorher	nachher	24 h	3-6 d
1	263	228	26	143
2	60	57	27	310
3	132	50	132	114
4	238	163	240	248
5	410	324	405	278
6	99	42	186	89
7	188	108	231	183
8	41	46	56	112
9	53	43	95	38
10	86	46	65	180
11	68	43	112	103
12	134	83	40	170
13	133	116	161	111
14	118	61	63	57

15	249	104	173	74
16	239	185	173	158
17	128	52	106	112
18	154	110	235	164
19	224	137	180	152
20	180	158	194	246
21	86	104	317	217
22	144	67	240	190
23	56	47	96	121
24	305	215	262	314

CD4/CD45RA positive Zellen:

Patientennr.	vorher	nachher	24 h	3-6 d
1	1079	868	909	993
2	405	380	360	353
3	405	345	323	335
4	502	414	479	546
5	458	303	568	592
6	347	244	960	200
7	475	388	696	524
8	194	152	184	244
9	117	78	148	97
10	462	353	644	412
11	456	435	812	588
12	429	177	322	248
13	582	493	844	713
14	553	333	514	334
15	202	119	218	154
16	383	337	466	466
17	215	152	245	192
18	268	224	398	348
19	706	287	461	369
20	566	466	391	497
21	590	391	879	883
22	147	90	167	136
23	296	292	319	385
24	357	315	252	352

7.2 Zytokinproduktion

(Angaben in % der Subpopulation)

IFN- γ in T-Helferzellen:

Patientennr.	vorher	nachher	24 h	3-6 d
1	2,16	3,00	0,31	n.d.
2	1,60	2,81	4,61	n.d.
3	4,54	9,06	1,58	3,03
4	2,66	3,23	7,67	3,88
5	4,85	9,35	5,03	2,88
6	3,07	3,68	3,95	3,40
7	3,53	6,08	3,06	7,03
8	2,71	2,35	3,54	6,16
9	11,30	11,93	6,22	6,75
10	3,06	6,75	4,49	1,51
11	3,32	7,41	3,17	4,61
12	4,62	10,51	11,19	4,31
13	10,01	6,61	7,24	7,84
14	2,66	2,71	4,17	2,51
15	17,50	12,93	20,36	8,36
16	4,67	6,14	6,71	3,82
17	4,31	7,22	14,23	12,15
18	5,86	8,68	11,23	7,96
19	5,11	8,06	6,35	6,69
20	5,34	5,34	7,74	3,63
21	2,26	2,52	7,52	6,34
22	7,05	11,37	18,28	21,06
23	6,66	6,94	9,56	7,09
24	9,80	9,46	10,57	10,32

Il-2 in T-Helferzellen:

Patientennr.	vorher	nachher	24 h	3-6 d
1	2,29	4,95	0,43	n.d.
2	3,54	3,15	6,40	n.d.
3	9,60	10,61	3,63	7,83
4	5,33	9,52	20,01	8,08
5	9,78	10,06	7,66	7,89
6	7,17	8,40	7,05	10,02
7	9,58	11,12	6,99	15,70
8	12,24	9,90	10,37	15,96
9	22,95	20,51	6,84	8,71
10	8,98	13,10	11,54	6,99

11	9,97	11,73	11,38	6,01
12	4,55	10,30	8,83	6,13
13	17,77	8,80	12,24	11,40
14	5,66	4,85	5,05	6,70
15	10,10	8,40	8,96	3,48
16	2,17	7,70	11,65	6,63
17	11,97	14,77	23,75	21,49
18	8,88	16,07	20,39	15,13
19	14,24	15,71	7,72	8,15
20	9,69	9,25	13,00	7,19
21	2,43	5,90	22,53	14,66
22	2,34	9,10	24,86	22,51
23	16,39	19,50	21,59	20,01
24	18,70	16,85	20,87	17,86

IFN- γ in T-Suppressorzellen:

Patientenr.	vorher	nachher	24 h	3-6 d
1	2,33	0,03	0,30	n.d.
2	2,59	3,52	3,83	n.d.
3	7,58	11,70	1,40	3,77
4	4,77	3,93	7,98	4,39
5	6,68	9,55	6,49	3,60
6	5,96	4,67	1,86	3,80
7	4,38	6,48	4,32	9,28
8	3,55	5,81	3,16	4,76
9	12,13	11,61	6,53	10,62
10	2,78	5,89	3,34	3,41
11	3,23	7,32	4,84	4,54
12	6,08	11,94	10,58	11,93
13	11,90	7,33	9,28	10,10
14	4,14	6,00	6,74	2,09
15	16,52	11,95	20,40	8,04
16	2,01	7,32	8,48	4,31
17	5,34	8,83	16,98	11,99
18	7,38	10,27	14,33	8,59
19	8,93	12,99	8,28	9,32
20	7,63	6,77	9,06	7,97
21	1,03	3,73	10,80	7,33
22	8,68	13,02	23,85	25,61
23	10,87	9,50	15,23	11,09
24	14,30	13,71	16,04	15,64

IFN- γ in T-Zellen:

Patientennr.	vorher	nachher	24 h	3-6 d
1	2,47	1,39	0,39	n.d.
2	2,49	3,63	4,46	n.d.
3	7,75	12,34	1,57	4,08
4	4,88	3,87	8,35	4,42
5	6,87	10,22	6,92	3,85
6	5,59	4,55	2,95	4,12
7	4,44	6,70	4,16	9,48
8	3,68	4,42	3,40	5,31
9	12,78	11,85	7,45	10,48
10	3,21	6,70	4,20	3,41
11	3,92	7,70	4,72	5,16
12	6,08	11,67	10,50	8,71
13	12,37	7,59	9,25	10,63
14	4,05	5,79	6,68	2,69
15	16,92	12,64	20,29	8,14
16	2,34	7,04	8,09	4,33
17	5,59	8,61	16,85	12,22
18	7,58	10,27	13,68	8,75
19	9,13	13,18	8,73	9,64
20	7,98	7,36	9,03	6,58
21	1,72	3,58	10,29	7,89
22	8,68	13,92	23,29	24,96
23	10,84	9,71	15,41	11,33
24	14,43	13,69	15,34	15,23

IFN- γ in NK-Zellen:

Patientennr.	vorher	nachher	24 h	3-6 d
1	0,00	6,31	0,10	n.d.
2	0,86	0,25	8,65	n.d.
3	4,30	4,79	0,63	6,75
4	10,56	10,50	11,02	0,30
5	3,50	5,02	5,38	0,98
6	9,64	9,68	2,15	1,88
7	6,79	4,11	1,57	8,16
8	11,98	10,59	4,33	1,76
9	24,25	15,61	3,22	4,58
10	1,55	2,74	3,63	3,94
11	1,91	3,82	3,53	4,84
12	7,38	10,43	2,88	11,96
13	7,09	6,34	5,67	15,56
14	0,01	1,41	3,26	7,58
15	3,28	2,58	4,25	1,20
16	1,97	0,88	14,42	5,52

17	7,72	9,90	20,94	6,84
18	2,16	9,17	8,63	10,28
19	14,72	12,07	3,63	2,93
20	7,32	1,40	2,22	5,82
21	1,92	7,91	18,75	15,08
22	5,25	5,00	11,85	17,51
23	11,40	6,41	16,39	12,53
24	14,12	8,27	18,48	9,71

Klinikum Großhadern

Abteilung für Transfusionsmedizin

in der Medizinischen Klinik III

Leiter: Prof. Dr. W. Mempel

Etikett

LMU**Ludwig —
Maximilians
Universität
München**

81377 München

Marchioninistraße 15

Durchwahl: (089) 7095 - 3710

Fax: (089) 7095 - 3707

Einverständnis und Aufklärung zur Entnahme von mononukleären Zellen**Sehr geehrte Spenderin, sehr geehrter Spender,**

mit Hilfe einer Zellseparators werden bei Ihnen mononukleären Zellen gewonnen.

Es werden Ihnen in je eine Vene des rechten und linken Armes eine Kanüle gelegt. Bei schlechten Venenverhältnissen muß über einen zentralen Katheter, der z. B. in die Halsvenen eingeführt wird, gesammelt werden. Das Blut wird unter Zusatz des gerinnungshemmenden Mittels Citronensäure in den Zellseparator geleitet und dort durch Zentrifugation aufgetrennt. Ein Teil der mononukleären Zellen wird entnommen und die übrigen Blutbestandteile fließen ständig über eine andere Vene zurück. Eine Sammlung dauert ca. zwei Stunden.

Die Zellseparation ist ein sehr sicheres und verträgliches Verfahren. Schwere Zwischenfälle sind extrem selten. Trotzdem müssen Sie über mögliche Nebenwirkungen informiert sein.

Die häufigsten möglichen Nebenwirkungen und Gefahren der Sammlung von mononukleären Zellen am Zellseparator sind:

- Kreislaufschwächen und Kreislaufkollaps wie bei einer Blutspende gekennzeichnet durch Schweißausbruch, Übelkeit, Erbrechen und eventuell auch Ohnmacht;
- Reaktionen durch das blutgerinnungshemmende Mittel Citronensäure, die sich durch Kribbeln an Fingerspitzen, Zehen und Mund, Muskelverkrampfung und Unregelmäßigkeiten des Herzschlages äußern können;
- vorübergehende Störung der Blutgerinnung durch den Verlust von Blutplättchen und die Gabe von blutgerinnungshemmenden Mitteln wie Citronensäure oder Heparin;
- Hämatom („blauer Fleck“), eine Venenentzündung oder eine Verletzung von Nerven an der Punktionsstelle.

Als äußerst seltene Komplikationen sind beschrieben:

- Schädigung von Blutzellen, Blutverlust;
- Luftembolie bei Ausfall von Sicherheitssystemen des Gerätes;
- Gerinnselbildung bei unzureichender Hemmung der Blutgerinnung;
- Verunreinigung mit Krankheitserregern;
- Überempfindlichkeitsreaktionen.

Durch frühzeitige Mitteilung von Mißempfindungen während und nach der Separation können Nebenwirkungen besser vermieden werden. Sie müssen uns vor der Sammlung über bekannte Beschwerden und Medikamenteneinnahmen informieren.

Sie sollten Ihre notwendigen Medikamente wie gewohnt einnehmen und nicht nüchtern erscheinen. Nach der Zellsammlung ist eine mindestens 30-minütige Ruhepause vorgesehen. Sie können nur durch den zuständigen Arzt entlassen werden.

Trotz aller von uns aufgebrauchten Sorgfalt kann es - zwar äußerst selten - vorkommen, daß durch technische Komplikationen die Separation nicht beendet werden kann oder das Präparat unbrauchbar ist. Die Apherese kann dann aber wiederholt werden. Für weitere Fragen stehen Ihnen die Ärzte und Ärztinnen der Abteilung gerne zur Verfügung.

Zudem erfolgen vor, nach der Apherese sowie 1 und 3 Tage später Blutabnahmen (jeweils 2 ml EDTA-Blut, 20ml Heparinblut). Aus diesen Proben werden Blutbild und Lymphozyten-subpopulationen bestimmt. Außerdem werden Kurzzeitkulturen zur Ermittlung der Zytokinproduktion bestimmter Lymphozytenpopulationen angelegt.

Im **Aufklärungsgespräch** mit Frau/Herrn Dr. _____ wurden ausführlich die maschinelle Gewinnung mononukleärer Zellen und mögliche Komplikationen erörtert.

Ich, _____, geb. am _____

habe den obenstehenden Text verstanden und hatte ausreichend Zeit und Gelegenheit beim Aufklärungsgespräch Fragen zu stellen. Meine Fragen wurden vollständig und für mich verständlich beantwortet. Sollte ein Zwischenfall bei der Zellseparation auftreten, bin ich mit den zur Abwendung gesundheitlicher Schäden notwendigen Maßnahmen einschließlich der Transfusion von Blutprodukten einverstanden.

Für Frauen: Ich versichere, nicht schwanger zu sein.

Nach gründlicher Überlegung

- willige ich in die vorgesehene Maßnahme der Gewinnung mononukleären Zellen ein.
- Ich bin damit einverstanden, daß mein Blut laborchemisch untersucht wird, auch auf Hepatitis und HIV (AIDS). Ein krankhafter Befund wird mir und den mich behandelnden Ärzten mitgeteilt. Für die Blutspende wesentliche Daten dürfen gespeichert werden. Ich habe das Recht, alle Untersuchungsergebnisse einzusehen.
- Ich bin mit der anonymen wissenschaftlichen Verwendung dieser Zellen einverstanden. Alle Zellen und Blutreste werden nach der Analyse verworfen bzw. vernichtet.
- Die Auswertung Ihrer Daten erfolgt in einer anonymisierten Form. Es werden keine persönlichen Daten weitergegeben.

oder

- Ich lehne eine Separation der mononukleären Zellen ab.

München, den _____

Patient/in (Unterschrift)

Arzt/Ärztin (Name/Unterschrift)

8. Literaturverzeichnis

8.1 Alphabetisches Autorenverzeichnis

Anderlini, P. et al.: Allogeneic Blood Stem Cell Transplantation: Considerations for Donors. *Blood* **90** (1997)

Begemann, H.: Klinische Hämatologie. Stuttgart 1993⁴

Biron, C.A., Byron, K.S., Sullivan J.L. : Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* **320** (1989)

Blumberg N., Heal J.M. : Transfusion and host defenses against cancer recurrence and infection. *Transfusion* **29** (1989)

Bryant, J.A. et al.: Effect of blood donation on the establishment of normal ranges of lymphocyte subsets. *Transfusion* **36** (1996)

Carrero, I. et al.: A Two-Year Flow-Cytometric Immune Surveillance of Plateletpheresis Donors. *Infusionsther Transfusionsmed* **27** (2000)

Chalmers, I.M.H. et al.: Intracellular Cytokine Profile of Cord and Adult Blood Lymphocytes. *Blood* **92** (1998)

Farrant, J. et al.: Study of B and T cell phenotypes in blood from patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Immunodeficiency* **5** (1994)

Ford, C.D. et al.: Blood Transfusion Lower Natural Killer Cell Activity. *Transplantation Proceedings* **19** (1987)

Gemsa, D., Kalden, J., Resch, K. (Hrsg.): Immunologie. Stuttgart ⁴1997

Gilcher, R.O.: Apheresis: Principles and Practices. In: Rossi, E.C. et al. (Hrsg.): Principles of Transfusion Medicine. Philadelphia 1996

Haley, N.R. und Snyder, E. L. (Hrsg.) : Hematopoietic Progenitor Cells: A Primer for Medical Professionals. Bethesda 2000

Han, P. und Hodge, G.: Intracellular cytokine production and cytokine receptor interaction of cord mononuclear cells: relevance to cord blood transplantation. *British Journal of Haematology* **107** (1999)

Heiss, M.M. et al.: Influence of Autologous Blood Transfusion on Natural Killer and Lymphokine-Aktivated Killer Cell Activities in Cancer Surgery. *Vox Sanguinis* **73** (1997)

Joshi, S.S.: Decreased immune functions of blood cells following mobilization with granulocyte colony-stimulating factor: association with donor characteristics. *Blood* **98** (2001)

Kessinger, A.: Clinical Features of Autologous and Allogenic Peripheral Blood Progenitor Cell Transplantation. In: McLeod, B.C., Price T.H., Drew M.J. (Hrsg.): Apheresis: Principles and Practice. Bethesda 1997

Kretschmer, V. et al.: Biokompatibilität und Sicherheit von Zytapheresen, *Infusionsther* 16: Suppl.2 (1989)

Lange, S. et al.: Immunologische Auswirkungen der Blutspende. *Beitr Infusionsther Transfusionsmed* **33** (1996)

Martinez, C. et al.: Effects of G-CSF administration and peripheral blood progenitor cell collection in 20 healthy donors. *Ann-Haematol.* **72** (1996)

Mc Cuollough, J.: Introduction to Apheresis Donations Including History and General Principles. In: McLeod, B.C., Price T.H., Drew M.J. (Hrsg.): Apheresis: Principles and Practice. Bethesda 1997

Mendes, R. et al. : Flow Cytometric Visualisation of Cytokine Production by CD3-CD56+ NK Cells and CD3+ CD56+ NK-T Cells in Whole Blood. *Cytometry* **39** (2000)

Mustafa, A. et al.: T-Cell Subsets and Cytokines Interplay in Infectious Disease. Basel 1996

Niethammer, D. : Gutartige quantitative und qualitative Erkrankungen des leukozytären Systems. In: Ostendorf, P. und Seeber, S.(Hrsg.): Hämatologie, Onkologie. München 1997

North, M.E. et al.: Intracellular cytokine production by human CD4+ und CD8+ T cells from normal und immunodeficient donors using directly conjugated anti-cytokine antibodies and three-colour cytometry. *Clin Exp Immunol* **105** (1996)

North, M.E. et al.: Primary defect in CD8+ lymphocytes in the antibody deficiency disease (common variable immunodeficiency): abnormalities in intracellular production of interferon-gamma (IFN- γ) in CD28+ ('cytotoxic') and CD 28- ('suppressor') CD8+ subsets. *Clin Exp Immunol* **111** (1998)

Poley, S.: Immunphänotypisierung von Lymphozyten. In: Rothe, G. und Schmitz, G.: Anwendungen der Durchflußzytometrie in der klinischen Zellsdiagnostik (Kursprogramm zum 12. Regensburger Kurs). Regensburg 1999

Price, T.H.: Leukapheresis and Stem Cell Harvest. In: Rossi, E.C. et al. (Hrsg.): Principles of Transfusion Medicine. Philadelphia 1996

Randels, M.J.: Selection and Care of Apheresis Donors. In: McLeod, B.C., Price T.H., Drew M.J. (Hrsg.): Apheresis: Principles and Practice. Bethesda 1997

Santagostino, A. et al.: An Italian national multicenter study for the definition of reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. *Haematologica* **84** (1999)

Simon, T.L. und McLead B.C.: Physiology of Apheresis. In: McLeod, B.C., Price T.H., Drew M.J. (Hrsg.): Apheresis: Principles and Practice. Bethesda 1997

Storek, J., Dawson, M., Maloney, D.: Normal T, B, and NK cell counts in healthy donors at 1 year after boold stem cell harvesting. *Blood* **95** (2000)

Theml, H.: Praktische Differentialdiagnostik in der Hämatologie und Onkologie: Leitsymptome und rationelle Befundinterpretation. Stuttgart 1998

Thews, A.: Allgemeine Methodik zum Nachweis von Oberflächenantigenen und cytoplasmatischer Strukturen. Coulter (ohne Jahresangabe)

Westby, M. et al.: Abnormal intracellular IL-2 and interferon gamma produktion as HIV-1-associated markers of immune dysfunction. *Clin Exp Immunol* **111** (1998)

Zotti, A. et al.: FACS-Analysis pf peripheral blood lymphocytes in lung transplant reciepients. *DG Klinische Chemie Mitteilungen* **25** (1994)

8.2 Verzeichnis der Zitate

- [1] Pschyrembel (Klinisches Wörterbuch). Berlin 1997 ²⁵⁸
- [2] Gilcher, R.O., Seite 537 ff.
- [3] Mc Cuollough, J., Seite 28
- [4] Mc Cuollough, J., Seite 31
- [5] Mc Cuollough, J., Seite 33 f.
- [6] Kessinger, A., Seite 423 f.
- [7] Price, T.H., Seite 554 f.
- [8] Kessinger, A., Seite 423 ff.
- [9] Kessinger, A., Seite 429
- [10] Gesellschaftsmitteilung 1998, *Infusionstherapie Transfusionsmedizin* 25 (1998) 326
- [11] Haley, N.R. und Snyder, E. L. (Hrsg.), Seite 172 ff.
- [12] Gilcher, R.O., Seite 541 ff.
- [13] Simon, T.L. und McLead B.C., Seite 76
- [14] Simon, T.L. und McLead B.C., Seite 67 ff.
- [15] Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz*. Springer-Verlag 2000, Seite 563 ff.
- [16] Randels, M.J., Seite 133 ff.
- [17] Kretschmer, V., Seite 10 ff.
- [18] Kretschmer, V., Seite 10 ff.
- [19] Becton Dickinson Biosciences: Immuncytometry Products Catalog 2000, Seite 167 ff.
- [20] Poley, S., Seite 5
- [21] Becton Dickinson: Beilage zum Simultest™ IMK-Lymphocyte, Seite 6
- [22] Becton Dickinson: Beilage zum Simultest™ IMK-Lymphocyte, Seite 25

- [23] Poley, S., Seite 7
- [24] Becton Dickinson: Beilage zum Simultest™ IMK-Lymphocyte, Seite 30
- [25] Becton Dickinson: Beilage zum Simultest™ IMK-Lymphocyte, Seite 30
- [26] mündliche Auskunft Dr. A. Crispin
- [27] Thews, A.
- [28] Becton Dickinson Biosciences: Immuncytometry Products Catalog 2000, Seite 186 ff.
- [29] Theml, H., Seite 153
- [30] Bryant, J.A., Seite 559 ff.
- [31] Bryant, J.A., Seite 559 ff.
- [32] Begemann, H., Seite 443
- [33] Niethammer, D., Seite 459
- [34] Lange, S., Seite 93 ff.
- [35] Anderlini, P., Seite 903 ff.
- [36] Santagostino, A., Seite 501ff.
- [37] Martinez, C., Seite 269 ff.
- [38] Storek, J., Seite 2993 f.
- [39] Bryant, J.A., Seite 559 ff.
- [40] Lange, S., Seite 93 ff.
- [41] Lange, S., Seite 93 ff.
- [42] Carrero, I., Seite 302 ff.
- [43] Zotti, A., Seite 164 f.
- [44] Farrant, J., Seite 159 ff.
- [45] Gemsa, D., Seite 38 ff.
- [46] North, M.E. (1996), Seite 517 ff.
- [47] North, M.E. (1998), Seite 70 ff.

- [48] Mustafa, A., Seite 213 ff.
- [49] Han, P., Seite 450 ff.
- [50] Ford, C.D., Seite 1456 f.
- [51] Heiss, M.M., Seite 237 ff.
- [52] Han, P., Seite 450ff.
- [53] Joshi, S.S, Seite 1963 ff.
- [54] Gemsa, D., Seite 38 ff.
- [55] Chalmers, I.M.H., Seite 11 ff.
- [56] Westby, M., Seite 257ff.
- [57] Lange, S., Seite 96
- [58] Martinez, C., Seite 272
- [59] Bryant, J.A., Seite 559 ff.
- [60] Anderlini, P., Seite 903 ff.
- [61] Biron, C.A., Seite 1731 ff.
- [62] Heiss, M.M., Seite 237 ff.
- [63] Blumberg N., Seite 236 ff.
- [64] Mendes, R., Seite 72 ff.

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Bildbestandteils eines Posters der Firma Fresenius
- Abb. 2 - 8 eigene Messung im Simulsetprogramm der Firma BD
- Abb. 9 -18 eigene Messung im CellQuestprogramm der Firma BD
- Abb.19 - 35 eigene Graphiken erstellt in Excel

Mein Dank gilt...

... Herrn Prof. W. Mempel für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, eigenständig in seiner Abteilung zu arbeiten.

... Frau Dr. S. Poley für die ausgezeichnete Betreuung, Unterstützung bei der Bewältigung von anfallenden Problemen und die rasche Korrektur

... Herrn Dr. O. Ochmann und Frau A. Blecks für das Durchführen der Apheresen und die freundliche Zusammenarbeit

... Herrn Dr. A. Crispin, der bei der statistischen Auswertung sehr hilfreich war

... den Damen und Herrn im Labor der Abteilung für Transfusionsmedizin, die nicht nur liebevoll ihren Arbeitsplatz teilten, sondern mich nach Kräften unterstützten

... den Probanden, die alle pünktlich zu den Blutabnahmen erschienen und damit den reibungslosen Ablauf der Arbeit ermöglichten

... den Mitarbeitern der Firma Becton Dickinson Deutschland für die Hilfe bei der Beschaffung von Materialien

... Monika für das kritische Lesen und die guten Gedanken

... meinen Eltern für die stets aufbauenden Worte und die Korrektur

... Oliver für Bearbeitung der Bilder, hilfreiche Tipps und die moralische Unterstützung in „schweren Zeiten“

Lebenslauf

Name: Waltraud Susanna Seisenberger

Geburtsdatum: 30.März 1977

Geburtsort: München

Konfession: römisch-katholisch

Schullaufbahn:

1983 -1987 Besuch der Josef-Maria-Lutz-Volksschule in Pfaffenhofen/Ilm

1987 - 1996 Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen Schyrengymnasiums in Pfaffenhofen/Ilm

1996 Reifeprüfung zur Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Studium:

1996 - 1998 1. Abschnitt des Studiums der Humanmedizin an der LMU München

1998 Ärztliche Vorprüfung

1999 - 2001 2. Abschnitt des Studiums der Humanmedizin an der LMU München

1999 Erstes Staatsexamen

2001 2. Staatsexamen

2001 - 2002 3. Abschnitt des Studiums der Humanmedizin an der LMU München

2002 3. Staatsexamen
