Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt

der Ludwigs-Maximilians-Universität München

ehemaliger Vorstand: Prof. Dr. D. Schlöndorff

jetziger Direktor: Prof. Dr. M. Reincke

Prädiktiver Wert des G-CSF-stimulierten Leukozytenwertes für die Blutstammzellsammlung nach IEV-Chemotherapie bei Lymphomen und multiplem Myelom

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christine Herzog, geb. von Osten

aus

Ludwigshafen/Rhein

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. C. Straka
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H.-J. Kolb
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	21.10.2004

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG 5

1.1 Der klinische Stellenwert einer Hochdosistherapie mit autologer hämatopoetischer Transplantation bei Lymphomen und multiplem Myelom.... 5

1.2 Von der Knochenmarktransplantation zur Blutstammzelltransplantation 7

1.2.1 Knochenmarktransplantation 7

1.2.2 Historie der peripheren Stammzelltransplantation 8

1.2.3 Vorteile der Blutstammzelltransplantation gegenüber der Knochenmarktransplantation 9

1.2.4 Stammzellmobilisierung 11

1.2.5 Stammzelldosis..... 13

1.3 Planung der Stammzellapheresen 13

1.4 Arbeitsziele 15

2 MATERIAL UND METHODEN 16

2.1 Patienten..... 16

2.2 Stammzellmobilisierung 16

2.3 Stammzellsammlung..... 17

2.4 Datenerhebung 18

2.5 Statistische Methoden..... 19

3 ERGEBNISSE 21

3.1 Patientenkollektiv 21

3.2 IEV-Chemotherapie mit G-CSF 22

3.3 Durchführung und Ergebnis der Stammzellapheresen 25

3.4 Einfluss der Tumordiagnose auf das Aphereseergebnis..... 28

3.5 Leukozytenverlauf nach IEV und unter G-CSF Stimulation 29

3.6 Ergebnisse der Stammzellsammlung in Abhängigkeit vom Tag des IEV-Regimes..... 31

3.7 Sammelergebnisse in Abhängigkeit von der Leukozytenzahl im Blut 33

3.8 Relative Effizienz der Leukozytenzahl im Blut für das Sammelergebnis..... 36

4 DISKUSSION 39

5 ZUSAMMENFASSUNG 49

6 LITERATURVERZEICHNIS 51

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1.1 Der klinische Stellenwert einer Hochdosistherapie mit autologer hämatopoetischer Transplantation bei Lymphomen und multiplem Myelom

Durch den Einsatz von Hochdosistherapien mit autologer Transplantation hämatopoetischer Stammzellen bei Lymphomen und multiplem Myelom können bei einem Teil der Patienten bessere Remissions- und Überlebensraten erreicht werden, als durch konventionell dosierte Chemotherapien.

Der Stellenwert einer Hochdosistherapie bei Patienten mit chemosensitivem Rezidiv hochmaligner Lymphome wurde durch die PARMA-Studie (Philip et al., 1995) belegt. Im Vergleich mit konventioneller Chemotherapie konnte durch die Hochdosistherapie mit autologer Knochenmarktransplantation ein krankheitsfreies Fünf-Jahres-Überleben von 46% (versus 12%) und eine Fünf-Jahres-Gesamtüberlebensrate von 53% (versus 32%) erreicht werden. Die bisherigen Transplantationsergebnisse bei niedrigmalignen Lymphomen zeigen, dass hierdurch die Progressionsfreiheit verlängert werden kann. Ein Vorteil für das Gesamtüberleben ist jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht belegt.

Durch den Einsatz von hochdosiertem Melphalan (100-140 mg/m^2) in der Behandlung des multiplen Myeloms wurde es möglich, komplette Remissionen zu induzieren, was durch konventionelle Chemotherapie nur in sehr seltenen Fällen gelang (McElwain et al., 1983; Cunningham et al., 1994). Eine prospektiv randomisierte Studie, die eine konventionelle Chemotherapie mit einer Hochdosistherapie bei Myelompatienten im Stadium II und III verglich, zeigte, daß durch die Hochdosistherapie die mediane Progressionsfreiheit von 18 Monaten auf 27 Monate verlängert und eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von 52% (versus 12%) erzielt wurde (Attal et al., 1996). Darüber hinaus konnte in der französischen IFM94-Studie gezeigt werden, dass eine Tandem-Hochdosistherapie gegenüber einer singulären Hochdosistherapie das Überleben weiter verbessern kann (Attal et al. 1992).

Die Hochdosistherapie mit autologer hämatopoetischer Transplantation ist die derzeitige Standardbehandlung von Patienten mit multiplem Myelom bis zu einem Alter von etwa 65 Jahren.

1.2 Von der Knochenmarktransplantation zur Blutstammzelltransplantation

1.2.1 Knochenmarktransplantation

Bis Mitte der 1980er Jahre wurde ausschließlich Knochenmark für die autologe Transplantation eingesetzt. Knochenmark stellt ein für die hämatopoetische Regeneration zuverlässiges aber träges Transplantat dar, dessen Stammzellgehalt relativ konstant ist. Um die Eignung für die Transplantation festzustellen, wurde nur eine Zählung der nukleären Zellen im Knochenmarktransplantat durchgeführt. Als Richtwert galt eine Zellzahl von $1x10^8$ nukleäre Zellen pro kg Körpergewicht. Die Dauer bis zum Wiederanwachsen des Transplantats mit Bildung reifer Blutzellen, dem Engraftment, beträgt zirka 2-4 Wochen (To et al., 1992; Beyer et al., 1995). Während der Zeit der Aplasie nach Hochdosistherapie besteht ein erhöhtes Blutungs- und Infektionsrisiko. Die therapieassoziierte Mortalität der autologen Knochenmarktransplantation liegt bei ca. 6% - 7% (Liberti et al., 1994; Majolino et al., 1995).

1.2.2 Historie der peripheren Stammzelltransplantation

In den 1950er Jahren wurde in Tierversuchen mit Ganz- und Teilkörperbestrahlung festgestellt, daß durch Strahlenschutz eines Teiles des hämatopoetischen Gewebes die Hämatopoese die bestrahlten Areale wieder besiedeln konnte. Dies wurde durch eine Migration der Stammzellen von den strahlengeschützten Gebieten in bestrahlte Gebiete über das Blut erklärt. 1962 wurde beschrieben, dass die im Knochenmark angesiedelten Stammzellen in geringer Menge auch ein permanenter Bestandteil des Blutes sind (Goodman et al.,1962). Die erste erfolgreiche Transplantation von peripheren Stammzellen wurde 1964 an Hunden durchgeführt. Bereits in dieser frühen Studie wurde die Beobachtung gemacht, dass die Dosis der reinfundierten Zellen einen wichtigen Faktor für die Regeneration der Blutbildung darstellte (Cavins et al., 1964). 1971 wurden schließlich das erste Mal mittels eines Blutzellseparators durch Leukapherese Stammzellen aus dem peripheren Blut gesammelt. Die Apherese selbst führte nicht zu einer Abnahme der zirkulierenden Stammzellen im Blut, da diese aus dem Knochenmark nachströmten (McCredie et al., 1971; Körbling et al., 1980).

Die Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut wurde erstmals 1971 beschrieben. Im Anschluss an eine Chemotherapie mit Cyclophosphamid und Adriamycin zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Stammzellkonzentration im peripheren Blut. Durch Apherese konnte so eine einem Knochenmarktransplantat entsprechende Zellmenge gewonnen werden (Richman et al., 1976).

Das erfolgreiche Anwachsen von Blutstammzellen nach Hochdosistherapie und Transplantation bei Patienten mit Wiederherstellung aller Blutzellreihen konnte 1985/86 von verschiedenen Gruppen gezeigt werden. (Juttner et al., 1985; Kessinger et al., 1986; Körbling et al., 1986; Reiffers et al., 1986). Anschließend erfuhr die periphere Stammzelltransplantation nach Hochdosistherapie eine breite Anwendung.

1.2.3 Vorteile der Blutstammzelltransplantation gegenüber der Knochenmarktransplantation

Die autologe Blutstammzelltransplantation hat bei der Behandlung von hämatologischen und onkologischen Erkrankungen zunehmend an Bedeutung

gewonnen und bietet gegenüber der Knochenmarktransplantation verschiedene Vorteile.

Blutstammzellen können ambulant durch Leukapherese gewonnen werden, während die Knochenmarkentnahme einen invasiven Eingriff darstellt, der in Vollnarkose im Operationssaal durchgeführt wird. Darüber hinaus können Leukapheresen auch an mehreren Tagen hintereinander durchgeführt werden, falls dies erforderlich ist.

Der bedeutendste Vorteil von Blutstammzellen liegt in einem beschleunigten Engraftment, d.h. die Dauer der Aplasie nach Hochdosistherapie wird durch den Einsatz von Blutstammzellen wesentlich verkürzt (To et al., 1992; Beyer et al., 1995; Henon et al., 1992; Sheridan et al., 1992). Das Neutrophilen- und Thrombozytenengraftment erfolgt häufig innerhalb von zwei Wochen (Rosenfeld et al., 1994). Dadurch ergibt sich eine kürzere Krankenhausaufenthaltsdauer, eine geringere therapieassoziierte Morbidität, ein reduzierter Bedarf an Transfusionen, weniger dokumentierte Infektionen (Henon et al., 1992) und insgesamt eine Kostenreduktion um 17%-25% (Hartmann et al., 1997; Smith et al., 1997; Russell et al., 1992). Trotz der Vorteile der Blutstammzelltransplantation besteht kein signifikanter Unterschied zur Knochenmarktransplantation bezüglich der

therapieassoziierten Mortalität und den längerfristigen Therapieergebnissen (Liberti et al., 1994; Brunvand et al., 1996; Schmitz et al., 1996; Brice et al., 1996).

1.2.4 Stammzellmobilisierung

Unter normalen Bedingungen zirkulieren nur vereinzelt Stammzellen im Blut (Udomsakdi et al., 1992), da sie im Knochenmark zurückgehalten werden. Dieses Phänomen beruht auf Adhäsionsmechanismen zwischen den Stammzellen und dem Knochenmarkstroma (Gordon et al., 1990; Simmons et al., 1992). Chemotherapie und hämatopoetische Wachstumsfaktoren (z.B. G-CSF) können die Adhäsionsmechanismen unterbrechen und in der Folge zu einer Ausschwemmung der Stammzellen aus dem Knochenmark führen.

Bei der Stammzellmobilisierung mit Chemotherapie kommt es nach Überwindung der Myelosuppression zu einem vorübergehenden Anstieg der Stammzellkonzentration im peripheren Blut (Richman et al., 1976; Pettengell et al., 1993). Durch Kombination mehrerer chemotherapeutischer Substanzen wird im Gegensatz zur Anwendung einzelner Substanzen eine effektivere Mobilisierung erreicht (Demirer et al., 1997; McQuaker et al., 1997). Der Einsatz von Chemotherapie zur Mobilisierung bietet den

Vorteil, dass zusätzlich eine Tumorreduktion im Patienten und im gewonnenen Transplantat erzielt werden kann.

Auch durch den hämatopoetischen Wachstumsfaktor G-CSF wird eine effektive Ausschwemmung hämatopoetischer Stammzellen vom Knochenmark in den Blutkreislauf erzielt (Socinski et al., 1988; Hansson et al., 1995). Eine Mobilisierung durch alleinigen Einsatz von Wachstumsfaktoren ist geeignet für Patienten, die sich bereits in Remission befinden oder für Patienten, bei denen eine hohe Toxizität durch die Mobilisierungs-Chemotherapie erwartet wird. Eine Kombination von Chemotherapie mit G-CSF oder GM-CSF erzielt die effektivste Mobilisierung (Demirer et al., 1996; Socinski et al., 1988; Haas et al., 1992). Das Ausmaß der Stammzellmobilisierbarkeit ist sehr variabel. Dies ist unter anderem bedingt durch die Art der Erkrankung und das Patientenalter (Pettengell 1995). Insgesamt zeigt sich eine Beeinträchtigung der Stammzellmobilisierung mit steigendem Umfang von Chemo- und Strahlentherapien (Dreger et al., 1995; Watts et al., 1997). Ein ausgeprägter Knochenmarkbefall wirkt sich wahrscheinlich auch nachhaltig auf die Mobilisierbarkeit von Stammzellen aus (Bensinger et al., 1994; Demirer et al., 1996).

1.2.5 Stammzelldosis

Zur Abschätzung der Dauer bis zum Engraftment ist die Bestimmung der Stammzellmenge im Transplantat erforderlich. In der Durchflußzytometrie werden die Stammzellen mittels Immunphänotypisierung über das Stammzellantigen CD34 gemessen. Die CD34-Messung bietet eine schnelle Verfügbarkeit der Ergebnisse.

Als Standarddosis für eine periphere Stammzelltransplantation gelten heutzutage 2 x 10^6 $CD34^+$-Zellen/kg Körpergewicht (To et al., 1992). Hierbei erfolgt das Neutrophilenengraftment (>500/μl) und das Thrombozytenengraftment (>20000/μl) häufig innerhalb von 14 Tagen (Negrin et al., 1995; Gianni et al., 1994). Einer optimierten Stammzelldosis entsprechen 5,0 x 10^6 CD 34^+-Zellen/kg, wodurch das Engraftment noch etwas beschleunigt werden kann und dann nur noch etwa 10 Tage benötigt werden (Weaver et al., 1995; Bensinger et al., 1995; Tricot et al., 1995).

1.3 Planung der Stammzellapheresen

Die Mobilisierung der Stammzellen beginnt nach Überwindung der durch die Chemotherapie verursachten Myelosuppression. Um den Zeitpunkt der Mobilisierung nicht zu versäumen, wurden die Leukapheresen in früheren Jahren häufig bereits bei

einem Leukozytenwert von 1000/µL begonnen. Es zeigte sich, dass die Ausschwemmung der Stammzellen aus dem Knochenmark bis zum Erreichen des Maximums häufig parallel zum Leukozytenverlauf erfolgt. Inwieweit jedoch der Leukozytenwert im Blut für die Planung der Apheresen herangezogen werden kann, ist jedoch nur unvollständig untersucht.

Da die maximale Stammzellmobilisierung auf einen Zeitraum von wenigen Tagen beschränkt und individuell verschieden ist, muss dieser optimale Zeitraum individuell erfasst werden. Neben der Leukozytenzählung kann die Kinetik der Stammzellausschüttung auch durch tägliches CD-34-Monitoring verfolgt werden. Da dies jedoch arbeits- und kostenaufwendig ist, erscheint es sinnvoll dieses Vorgehen auf besondere Fälle zu beschränken.

Durch eine Vorhersage der Stammzellausbeute kann die Anzahl der Apherese-sitzungen begrenzt werden. Dies ist mit einer geringeren Belastung für Patienten, Tagesklinik- und Laborbereich und einer Verringerung der Kosten verbunden.

1.4 Arbeitsziele

Das Ziel dieser Arbeit war, die Ergebnisse der Stammzellsammlung nach IEV-Chemotherapie und unter G-CSF-Gabe zu analysieren. Insbesondere sollte der prädiktive Wert der Leukozytenzahl vor Leukapherese für die Stammzellausbeute bestimmt werden. Darüber hinaus sollte, falls möglich, ein prädiktives Modell der Stammzellausbeute basierend auf der Leukozytenkinetik nach Überwindung der Myelosuppression entwickelt werden, um so einen praktischen Anhalt über die Wahl des Zeitpunkts der Apherese zu haben.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patienten

Die untersuchten Patienten mit einem Lymphom oder multiplen Myelom wurden im Zeitraum von Juni 1994 bis Juli 1998 an der Medizinischen Klinik Innenstadt der Ludwig - Maximilians - Universität München behandelt. Es handelte sich um Patienten mit refraktären oder rezidivierten Lymphomen und Patienten mit multiplen Myelomen im Stadium II und III.

2.2 Stammzellmobilisierung

Die Stammzellmobilisierung wurde bei allen Patienten mit der IEV-Kombinationschemotherapie und der Gabe von G-CSF (Neupogen) durchgeführt. Das IEV-Regime besteht aus den Substanzen Ifosfamid (2500mg/m^2 Körperoberfläche intravenös, verabreicht an Tag 1-3), Etoposid (150mg/m^2 intravenös, verabreicht an Tag 1-3) und Epirubicin (100mg/m^2 intravenös, verabreicht an Tag 1). Ab Tag 5 nach Beginn der IEV-Therapie wird G-CSF (Granulozyten-stimulierender Faktor) in einer Dosierung von 5μg/kg subkutan täglich bis zur letzten Apherese gegeben.

2.3 Stammzellsammlung

Die Stammzellsammlungen wurden mit entsprechend der medizinischen Geräteverordnung zugelassenen Zellseparatoren in der Tagesklinik der Medizinischen Klinik Innenstadt durchgeführt, entweder mit dem Cobe Spectra-Separator der Firma Cobe (Kirchheim-Heimstetten, Deutschland) oder mit dem AS 104-Separator der Firma Fresenius (Bad Homburg, Deutschland). Ein kontinuierlicher Blutfluss zum Separator und vom Separator zurück zum Patienten wurde über periphere Venen oder zentrale Venenzugänge ermöglicht. Die erforderliche Antikoagulation im Schlauchsystem wurde mit Zitrat durchgeführt. Normalerweise wurden 10-12 Liter Blutvolumen pro Apherese prozessiert. Die Dauer hierfür betrug bei einer Flussgeschwindigkeit von 50 ml/min $3^{1/2}$ -4 Stunden. Die Stammzellsammlungen wurden normalerweise bei Leukozytenwerten um 10 000/µl begonnen und an aufeinanderfolgenden Tagen so lange durchgeführt, bis wenn möglich mindestens $2x10^6$ CD-34 Zellen/kg KG gesammelt waren. Die Patienten wurden intensiv bezüglich an der Apherese auftretenden Nebenwirkungen überwacht, insbesondere Zitratreaktionen. Zur Qualitätsprüfung des peripheren

Stammzellproduktes wurde die Zellzahl, die Menge an CD-34 Zellen und an koloniebildenen Zellen und mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt.

2.4 Datenerhebung

Im Rahmen der Datenerfassung wurde aus den Patientenakten die Diagnose, das Alter, das Geschlecht, das Stadium der Erkrankung, die Vortherapie durch Chemo- und Strahlentherapien und das Vorhandensein einer Knochenmarksinfiltration vor Mobilisierung dokumentiert. Die tatsächlich verabreichte IEV-Dosis und der genaue Zeitraum der G-CSF Gabe wurde festgehalten. Desweiteren wurden die Leukozytenwerte von Tag 1, Tag 10 und Tag 13 (gerechnet ab IEV-Beginn), sowie der Leukozytenwert vor Apherese und der Tag und Wert des Leukozytennadirs erfasst. Diese Werte wurden in die Excel-Datei eingegeben.

Zur Erfassung der Menge an koloniebildenden Zellen im Blut vor Apherese bzw. im Aphereseprodukt wurden die im Colony Assay ausgezählten Kolonien auf die in den Assay eingesetzte Menge an mononukleären Zellen in Bezug gesetzt. Die Berechnungen wurden getrennt nach CFU-GM und BFU-GM durchgeführt. Da festgehalten worden war, wie viele mononukleäre Zellen pro ml Blutprobe vor

Apherese bzw. pro ml Aphereseprodukt enthalten waren, konnte auf die Konzentration der koloniebildenen Zellen pro ml Blutprobe bzw. Aphereseprodukt rückgeschlossen werden. Die Menge an CFU-GM bzw. BFU-GM pro ml Blut bzw. Aphereseprodukt wurden in die Excel-Datei eingetragen.

Aus den Analysen der Durchflußzytometrie wurden die CD34- und CD19 Werte des peripheren Blutes vor Apherese, sowie des Aphereseproduktes in die Excel-Datei übertragen.

2.5 Statistische Methoden

Die ermittelten Daten zu den Zellzahlen weisen grundsätzlich eine nicht normale, positiv schiefe Verteilung auf. Zur statistischen Deskription wurden daher durchwegs robuste Kennwerte, zur Durchführung statistischer Vergleiche nicht parametrische Testverfahren verwendet.

Die statistische Analyse der Daten erfolgte primär deskriptiv unter Angabe von prozentualen Häufigkeiten, Medianen, Quartilen und Wertebereichen. Als Test zum Vergleich der Zellzahlen zwischen verschiedenen Gruppen von Leukapheresen bzw. Patienten wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney- (bei zwei Gruppen) bzw. der Kruskal-

Wallis-Test (bei mehr als zwei Gruppen) angewendet. Alle angegebenen p-Werte sind zweiseitig.

3 ERGEBNISSE

3.1 Patientenkollektiv

Der Zusammenhang zwischen G-CSF-stimuliertem Leukozytenwert vor Apherese und dem Sammelergebnis der Stammzellapherese wurde bei 101 Patienten untersucht. Bei 60 Patienten lag ein malignes Lymphom, bei 41 Patienten ein multiples Myelom vor. In Tabelle 1 sind die Patientencharakteristika dargestellt. Der Altersmedian lag bei 52 Jahren, 44% der Patienten waren weiblich, 56% der Patienten männlich. Der Großteil der Patienten hatte zum Zeitpunkt der Stammzellmobilisierung bereits mehrere Zyklen Chemotherapie erhalten. Alle Patienten außer einem waren mit mindestens einem chemotherapeutischen Regime vorbehandelt. Eine Bestrahlung vor Stammzellmobilisierung war bei 37% der Patienten erfolgt.

Patienten		
N	**101**	
Diagnose		
LYM	**60**	
MM	**41**	
Geschlecht		
M	**57**	
W	**44**	
Alter (Jahre)		
Median (Bereich)	**52**	**(28 - 68)**
Zyklen Chemotherapie		
Median (Bereich)	**6**	**(0 - 28)**
Bestrahlung		
Ja	**37**	
Nein	**64**	

Tabelle 1: Charakteristika der Patienten mit Stammzellapherese nach IEV-Chemotherapie und G-CSF.

LYM = Lymphom; MM = Multiples Myelom; M = Männlich; W = Weiblich

3.2 IEV-Chemotherapie mit G-CSF

Die Patienten erhielten zur Tumorreduktion und Stammzellmobilisierung das IEV-Chemotherapieregime, eine dreitägige intravenöse Chemotherapie mit den Substanzen Ifosfamid, Epirubicin und Etoposid, gefolgt von der Gabe des Granulozyten Kolonie-stimulierenden Faktors (G-CSF) (Tabelle 2). Die Gabe von G-CSF erfolgte zum einen zur Abschwächung der Neutropenie nach der intensiven IEV-Chemotherapie, zum anderen zur Steigerung der Stammzellmobilisierung nach

Überwindung der Myelosuppression. G-CSF wurde ab Tag 5 in einer Dosierung von 5 μg/kg Körpergewicht abends subkutan appliziert.

Substanz	Dosierung	Applikation	Gabe
Ifosfamid	**2.500 mg/m^2**	**i.v.**	**Tag 1 - 3**
Epirubicin	**100 mg/m^2**	**i.v.**	**Tag 1**
Etoposid	**150 mg/m^2**	**i.v.**	**Tag 1 - 3**
G-CSF (Neupogen)	**5μg/kg**	**s.c.**	**Tag 5 bis Aphereseende**

Tabelle 2: IEV-Chemotherapie mit G-CSF.

i.v. = intravenös; s.c. subcutan

Die IEV-Chemotherapie wurde im Rahmen von Hochdosistherapie-Protokollen eingesetzt. Bei rezidivierten Lymphomen wurden in der Regel 3 Zyklen IEV vor Hochdosistherapie gegeben. Die Transplantation der Blutstammzellen erfolgte nach Hochdosis Busulfan (16 mg/kg)/Cyclophosphamid (120 mg/kg) (BUCY). Beim multiplen Myelom wurde die IEV-Chemotherapie nach 3 Zyklen Induktionstherapie

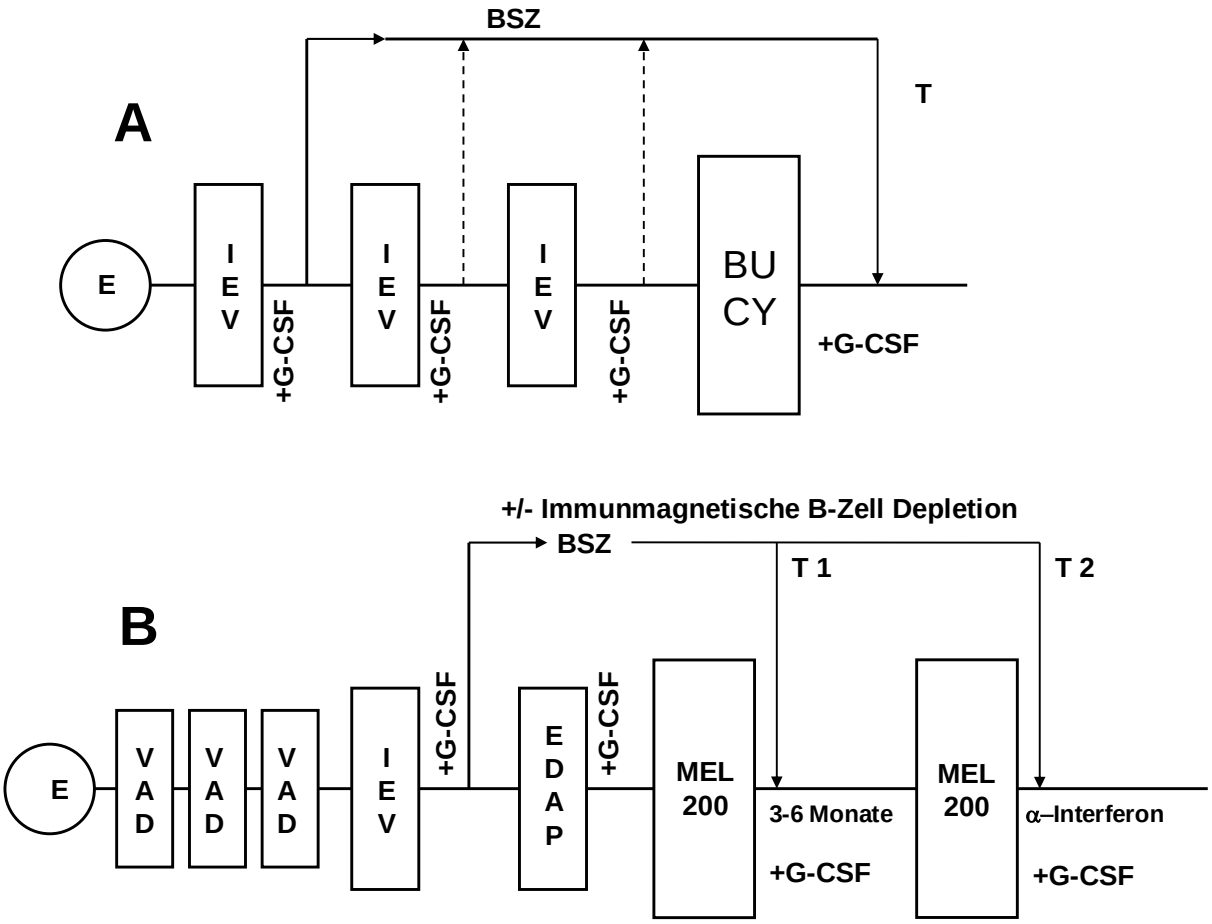

Abbildung 1: IEV-Chemotherapie im Rahmen von Hochdosisprotokollen bei rezidivierten Lymphomen und multiplem Myelom.

E = Studieneinschluß; BSZ = Blutstammzellen; T = Transplantation

mit dem VAD-Regime (Vincristin, Doxorubicin, Dexamethason) durchgeführt. Bei Patienten ohne Einschränkung der Nierenfunktion konnte anschließend das EDAP-Regime (Etoposid, Dexamethason, Cytarabin, Cisplatin) gegeben werden. Anschließend erfolgte eine Tandem-Hochdosistherapie mit Melphalan 200 mg/m^2 (MEL200) im Abstand von 3–6 Monaten mit jeweiliger autologer Blutstammzelltransplantation.

3.3 Durchführung und Ergebnis der Stammzellapheresen

Die Stammzellapheresen wurden begonnen, wenn nach dem Nadir die Leukozyten schnell anstiegen und zwischen 5000 und 10000 / µL oder darüber lagen (Abbildung 2). Die Einzelheiten zu den Stammzellapheresen sind in Tabelle 3 aufgeführt. Pro Patient wurden im Median 3 (Bereich 1-8) Apheresen durchgeführt, insgesamt 307. Während der Stammzellapherese, die normalerweise 3-4 Stunden dauerte, wurden in etwa 10 Liter Blut prozessiert. Verwendet wurden hierfür der Cobe Spectra-Zellseparator (Cobe, Heimstetten, Deutschland) oder der AS104-Zellseparator (Fresenius, St. Wendel, Deutschland). Der Sammlungstag nach Beginn des IEV-Regimes war im Median der Tag 15 (Bereich 12-37 Tage). Der Leukozytenwert vor Apherese lag im Median bei 22300 Leukozyten / µL (Bereich 2500-89000 / µL). Die Anzahl der $CD34^+$ Zellen zu diesem Zeitpunkt im Blut lag bei 78/µL (1-2002/µL).

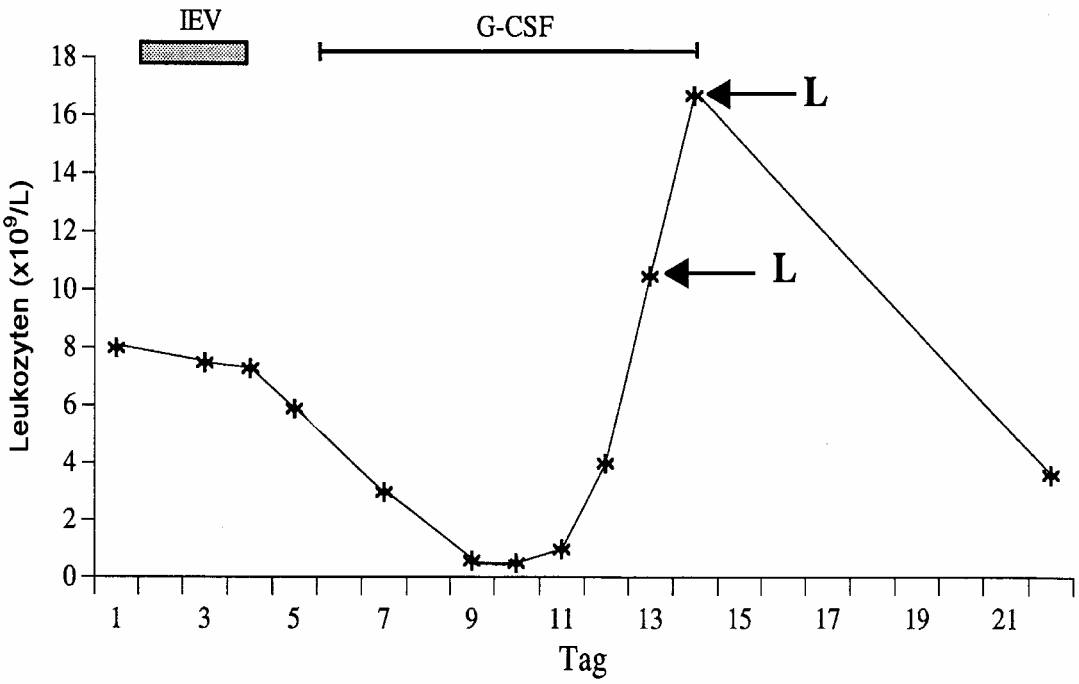

Abbildung 2: Leukozytenverlauf nach IEV-Chemotherapie und G-CSF.
L = Zeitpunkte der Stammzellapherese bei einem Lymphompatienten.

Mit einer einzelnen Stammzellapherese wurden im Median 4,32 (Bereich 0,01-40,87) x 10^6 $CD34^+$ Zellen/kg gesammelt. Mindestens 2 x 10^6 $CD34^+$ Zellen/kg, die der Standarddosis für eine autologe Stammzelltransplantation entsprechen, wurden bei 199 von 307 Apheresen (65%) gewonnen, mindestens 5 x 10^6 $CD34^+$ Zellen/kg, was einer optimierten Stammzelldosis entspricht, bei 139 von 307 Apheresen (45%).

Stammzellapheresen		
N (%)	**307**	**(100%)**
Sammlung nach IEV-Zyklus		
1	**185**	**(60%)**
2	**83**	**(27%)**
>2	**39**	**(13%)**
IEV-Dosierung		
100%	**206**	**(67%)**
<100%	**101**	**(33%)**
Anzahl der Apheresen pro Patient		
Median (Bereich)	**3**	**(1-8)**
Zellseparator		
AS104	**119**	**(39%)**
Cobe Spectra	**188**	**(61%)**
Prozessiertes Blutvolumen (mL)		
Median (Bereich)	**10.832**	**(1.101 - 15.232)**
Sammlungstag nach IEV-Regime		
Median (Bereich)	**15**	**(12 - 37)**
Leukozyten (/µL) im Blut vor Apherese		
Median (Bereich)	**22.300**	**(2.500 - 89.000)**
$CD34^+$-Zellen (/µL) im Blut vor Apherese		
Median (Bereich)	**78**	**(1 - 2002)**
Gesammelte $CD34^+$-Zellen (10^6 /kg)		
Median (Bereich)	**4,32**	**(0,01 - 40,87)**

Tabelle 3: Charakteristika der Stammzellapheresen nach IEV-Chemotherapie und G-CSF

3.4 Einfluss der Tumordiagnose auf das Aphereseergebnis

Es wurde untersucht, ob es bezüglich der Stammzellausbeute Unterschiede zwischen den Patienten mit multiplem Myelom und Lymphom gab. Hierbei zeigten sich etwas höhere Stammzellausbeuten beim multiplen Myelom. Im Median wurden beim multiplen Myelom pro Stammzellapherese 5,32 x 10^6 $CD34^+$ Zellen/kg gesammelt, bei Lymphompatienten im Vergleich hierzu 3,39 x 10^6 $CD34^+$ Zellen/kg. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (p=0,19) (Tabelle 4 und Abbildung 3).

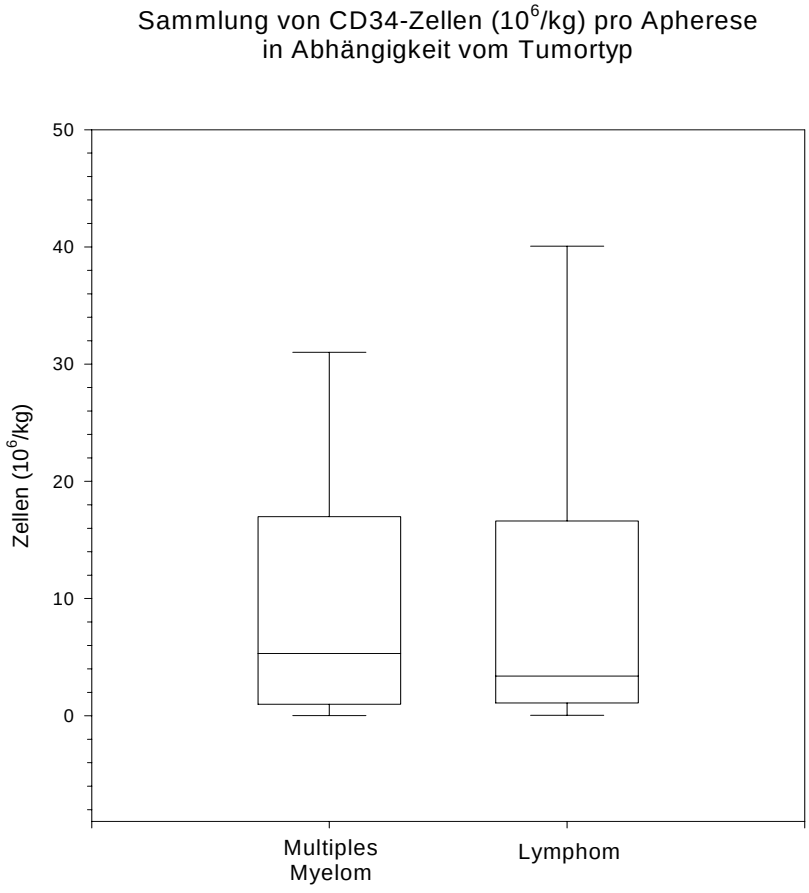

Abbildung 3: Sammlung von $CD34^+$ Zellen (10^6/kg) pro Apherese in Abhängigkeit von der Tumordiagnose.

	n	Minimum	Unteres Quartil	Median	Oberes Quartil	Maximum
Multiples Myelom	129	0,01	1,32	5,32	12,31	31,02
Lymphom	178	0,05	1,43	3,39	8,8	40,07

Tabelle 4: Ausbeute an $CD34^+$ Zellen ($x10^6$/kg) pro Apherese in Abhängigkeit von der Tumordiagnose.

3.5 Leukozytenverlauf nach IEV und unter G-CSF Stimulation

Im Verlauf nach IEV-Chemotherapie und unter G-CSF trat zunächst der Leukozytennadir etwa am Tag 10 nach IEV-Beginn auf. Anschließend kam es zu einem starken Anstieg der Leukozyten im Blut unter der fortgesetzten Gabe von G-CSF. Diese Phase des Leukozytenanstiegs im Blut war individuell hinsichtlich des Beginns und der Stärke variabel (Tabelle 6 und Abbildung 5). Die kumulativen Daten der Leukozytenwerte für die einzelnen Apheresetage stellten sich wie folgt dar:

	n	Minimum	Unteres Quartil	Median	Oberes Quartil	Maximum
Tag 13	17	6000	11000	16000	19300	31240
Tag 14	58	3600	12200	22200	31400	89000
Tag 15	82	2500	12700	25400	35260	88200
Tag 16	57	4600	15000	24150	41000	74000
Tag 17	34	6600	16300	25050	33700	55260
Tag >17	58	4400	13000	19250	33200	64200

Tabelle 6: Leukozyten (pro µL) vor Apherese in Abhängigkeit vom Apheresetag.

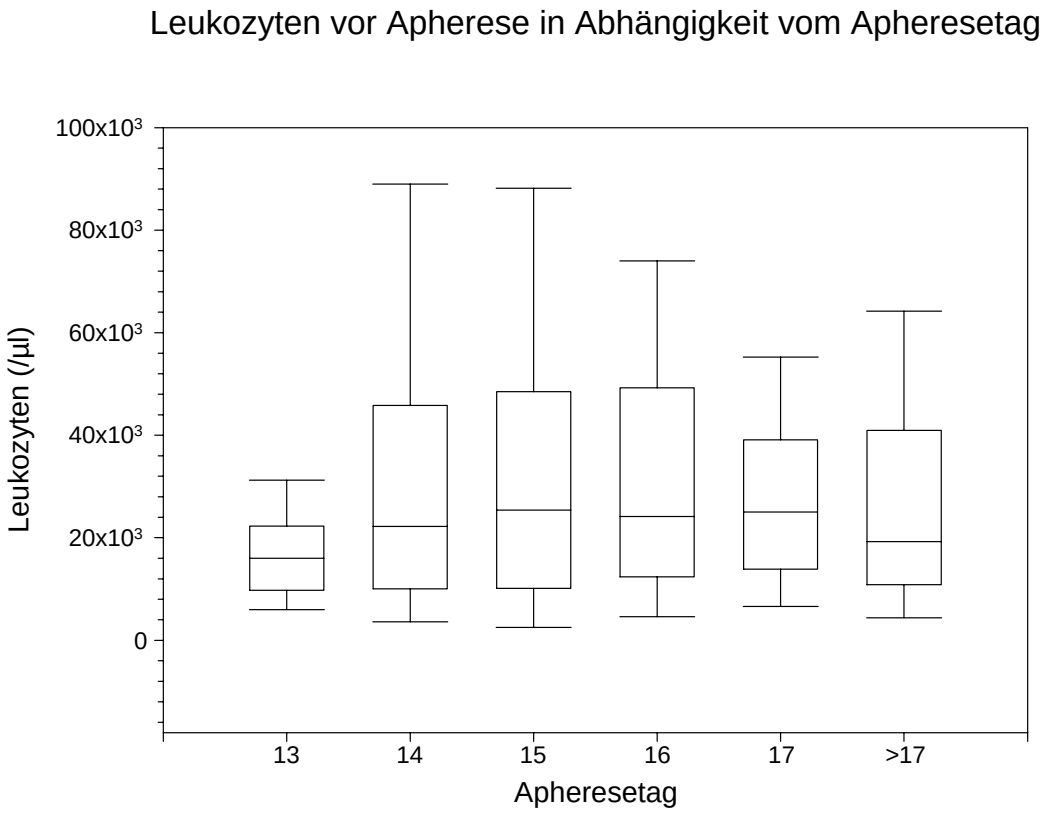

Abbildung 5: Leukozyten vor Apherese in Abhängigkeit vom Apheresetag.

Von Tag 13-15 war ein Leukozytenanstieg zu verzeichnen, bei Tag 15-17 stellte sich ein Plateau bei im Median von etwa 25000 Leukozyten/µL ein. Nach Tag 17 fielen die Leukozytenwerte wieder ab. Die Ausbildung des Plateaus in den kumulativen Daten ist durch den interindividuell zeitvariablen Leukozytenanstieg bedingt. Die späten Sammlungen nach Tag 17 wurden bei Patienten mit verzögertem und begrenztem Leukozytenanstieg durchgeführt. Deswegen fiel in der kumulativen Darstellung die Leukozytenzahl vor Apherese bei den Sammlungen nach Tag 17 wieder ab.

3.6 Ergebnisse der Stammzellsammlung in Abhängigkeit vom Tag des IEV-Regimes

Für die CD34-Ausbeute pro Apherese bestand über die verschiedenen Apheresetage hinweg betrachtet statistisch kein signifikanter Zusammenhang (p=0,53). Das Maximum der Stammzellausbeute zeigte sich an den Tagen 14 –16 (Tabelle 7 und Abbildung 6). Davor und danach waren die Sammelergebnisse geringer.

	n	Minimum	Unteres Quartil	Median	Oberes Quartil	Maximum
Tag 13	17	1,09	2,19	3,54	8,60	25,08
Tag 14	58	0,10	1,64	6,17	13,12	40,87
Tag 15	82	0,11	1,50	5,23	11,32	33,64
Tag 16	57	0,14	1,69	4,57	11,01	34,79
Tag 17	34	0,01	1,13	2,31	9,09	25,58
Tag >17	58	0,05	0,73	1,83	4,82	29,1

Tabelle 7: Ausbeute an $CD34^+$ Zellen ($x10^6$/kg) pro Apherese in Abhängigkeit vom Apheresetag.

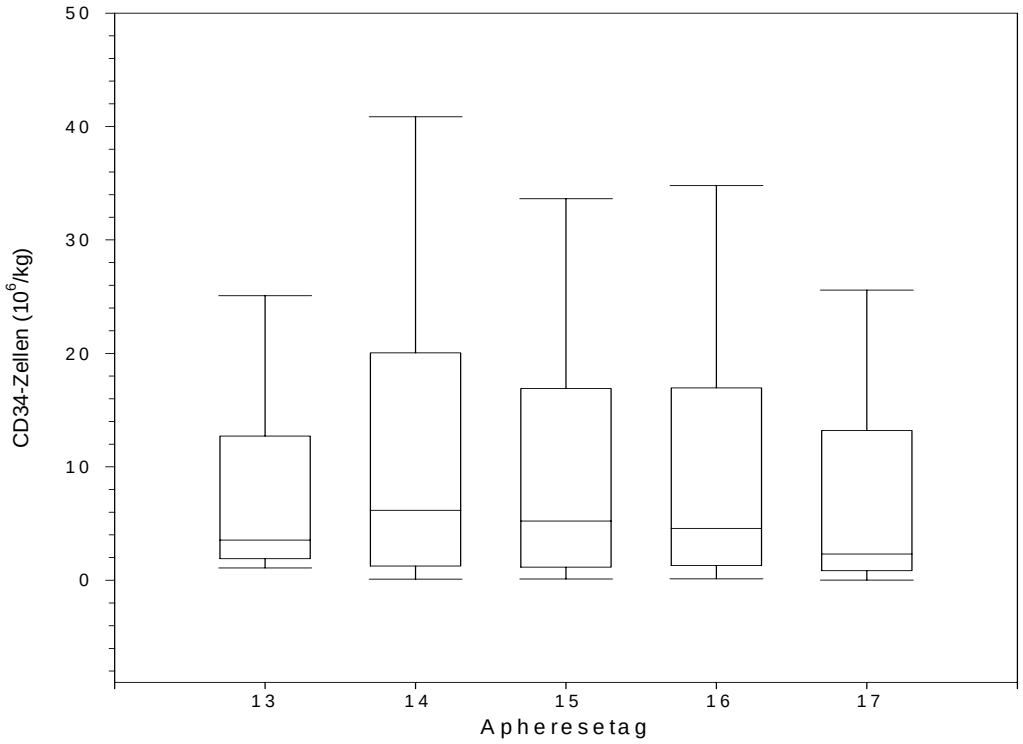

Abbildung 6: Ausbeute an $CD34^+$ Zellen (10^6/kg) pro Apherese in Abhängigkeit vom Apheresetag.

Das Mobilisierungs-und Sammlungsmaximum an Tag 14-16 fällt bei planmäßigem Beginn von IEV an einem Mittwoch auf den Zeitraum Dienstag bis Donnerstag zwei Wochen später und liegt somit innerhalb der Arbeitswoche.

3.7 Sammelergebnisse in Abhängigkeit von der Leukozytenzahl im Blut

Mit zunehmender Leukozytenzahl vor Apherese stieg das Sammelergebnis kontinuierlich an und ergab einen statistisch hochsignifikanten Zusammenhang (p = 0,0001) (Tabelle 8 und Abbildung 7).

Leukozyten bei Apherese (/[l)	n	Minimum	Unteres Quartil	Median	Oberes Quartil	Maximum
<10000	39	0,01	0,18	0,84	2,56	19,91
10000 - <20000	97	0,05	1,08	1,89	6,44	29,10
20000 - <30000	64	0,12	1,97	4,56	10,12	31,02
30000 - <40000	50	0,31	3,12	7,05	15,09	33,64
≥40000	57	0,13	5,11	9,13	14,63	40,87

Tabelle 8: Ausbeute an $CD34^+$ Zellen (10^6/kg) pro Apherese in Abhängigkeit von der Leukozytenzahl im Blut vor Apherese.

Der Median des erzielten Sammelergebnisses lag bei einer Leukozytenzahl ≥40000/µL im Blut vor Apherese um den Faktor 10 höher als der Median des Sammelergebnisses bei niedrigen Leukozytenzahlen <10000/µL.

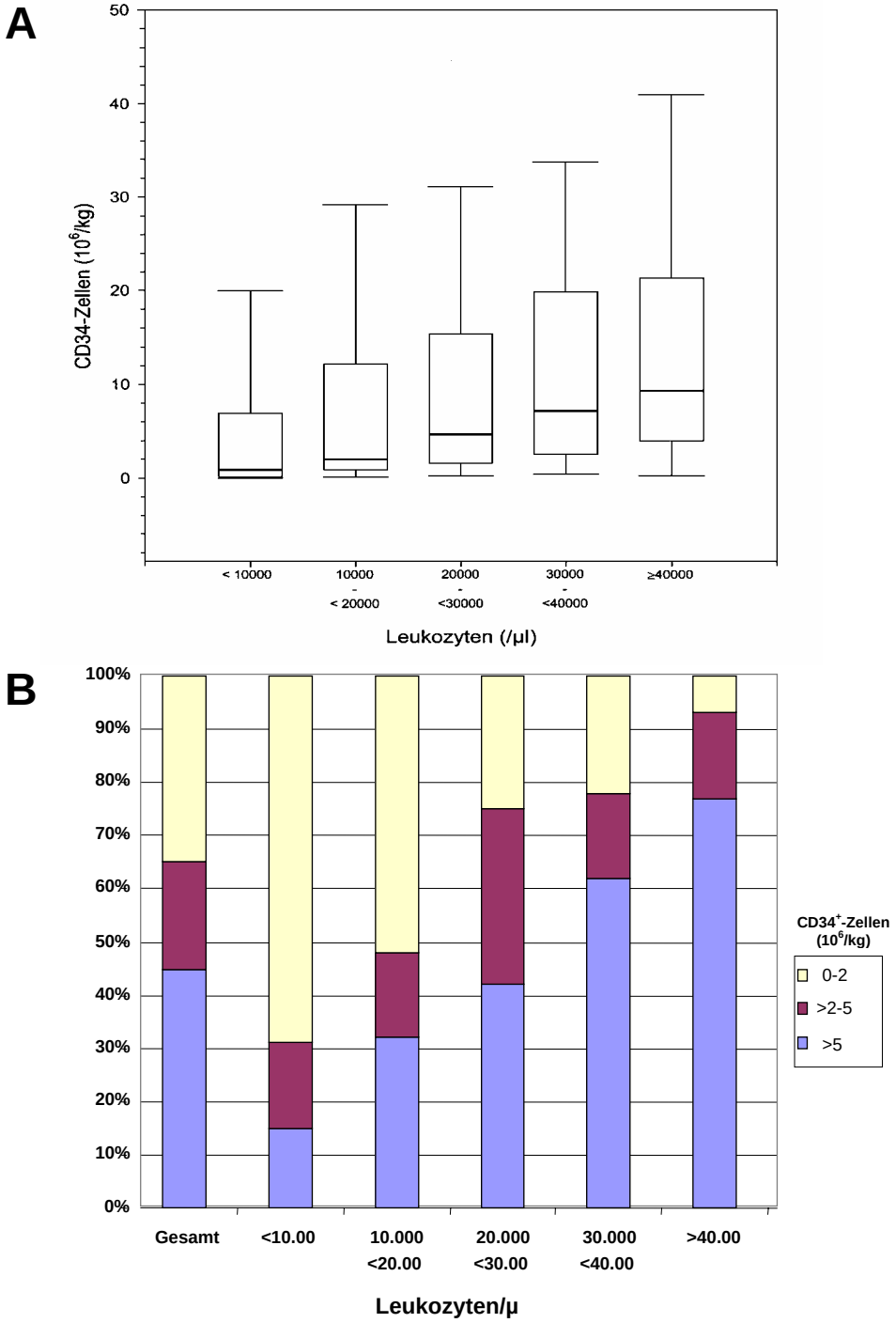

Abbildung 7: Zusammenhang zwischen Leukozyten im Blut bei Apherese und dem Sammelergebnis an $CD34^+$-Zellen.

A: Box-plot-Darstellung (Median, Quartilen, Minimal- und Maximalwert) der gesammelten $CD34^+$-Zellen für die über den Leukozyten im Blut bei Apherese gebildeten Kategorien ($p<0,0001$).

B: Kategorisierung der gesammelten $CD34^+$-Zellen und deren Anteil innerhalb der Leukozytenkategorien.

Dementsprechend war auch das anteilmäßige Erreichen von CD34-Zielwerten stark an den Leukozytenwert gebunden. Je höher die Leukozytenwerte im Blut vor Apherese waren, desto größer war der Anteil der Sammlungen, die mit einem Ergebnis von >2,0 x 10^6 $CD34^+$ Zellen / kg (Standarddosis) oder mit >5,0 x 10^6 $CD34^+$ Zellen / kg (Optimierte Dosis) abgeschlossen werden konnten (siehe Tabelle 9). Bei normaler Leukozytenzahl vor Apherese <10000/µL konnte die Standarddosis an $CD34^+$ Zellen nur in 31%, die optimierte Stammzelldosis nur in 15% der Apheresen erzielt werden. Hingegen wurden bei Leukozytenzahlen ≥40000/µL die Standarddosis bei 93% und die optimierte Dosis bei 77% der Apheresen ereicht.

		Leukozytenzahl bei Apherese (/µl)				
CD34-Ausbeute	**gesamt**	**<10000**	**10000-<20000**	**20000-<30000**	**30000-<40000**	**>40000**
n	307	39	97	64	50	57
>2x10^6/kg	199 (64%)	12 (31%)	47 (48%)	48 (76%)	39 (78%)	53 (93%)
>5x10^6/kg	139 (45%)	6 (15%)	31 (32%)	27 (42%)	31 (62%)	44 (77%)

Tabelle 9: Anteilmäßiges Erreichen der Zielwerte 2 und 5 x 10^6 $CD34^+$ Zellen / kg pro Apherese in Abhängigkeit von der Leukozytenzahl vor Apherese.

3.8 Relative Effizienz der Leukozytenzahl im Blut für das Sammelergebnis

Generell zeigte sich wie unter Punkt 3.7 beschrieben eine hochsignifikante Korrelation zwischen steigendem Leukozytenwert und zunehmendem Sammelergebnis. Nachdem die Leukozytenregeneration nach dem Nadir jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten einsetzte, stellte sich die Frage, ob dies einen Einfluss auf den Zusammenhang zwischen Leukozytenwert im Blut und Sammelergebnis hatte. Zu diesem Zweck wurde ein relativer Effizienzfaktor der Leukozytenzahl für das Sammelergebnis errechnet. Hierfür wurde der Quotient aus gesammelter $CD34^+$ Zellmenge und Leukozytenzahl gebildet. Die relative Effizienz wurde berechnet indem der Median dieser Quotienten für einzelne Apheresetage des IEV-Zyklus durch den Gesamt-Median geteilt wurde. Die so berechnete relative Effizienz des Leukozytenwerts für die Stammzellausbeute ist in Abbildung 8 für die einzelnen Apheresetage gezeigt und nahm mit zunehmendem Zeitintervall kontinuierlich ab ($p=0,0004$).

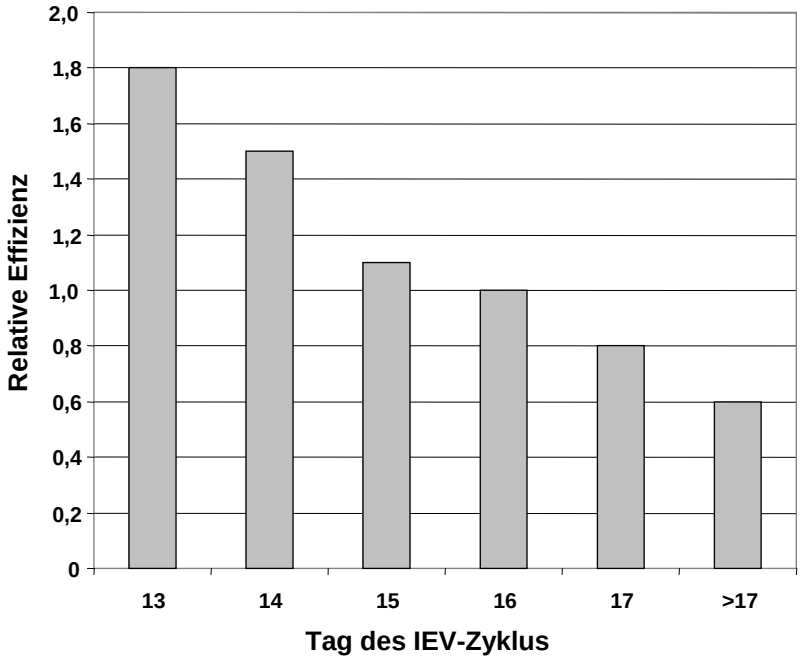

Abbildung 8: Relative Effizienz der Leukozytenzahl für das Sammelergebnis an $CD34^+$-Zellen (p = 0,0004)

Relative Effizienz = Verhältnis von gesammelten $CD34^+$ Zellen zur Leukozytenzahl an jedem Apheresetag in Relation zum Gesamt-Median dieser Quotienten.

Der Zusammenhang zwischen Leukozytenwert vor Apherese und CD34-Sammelergebnis sowie der relative Effizienz-Faktor des Leukozytenwerts wurden verwendet, um ein Modell der Stammzellausbeute zu erstellen, das auf der Leukozytenkinetik basiert (Abbildung 9).

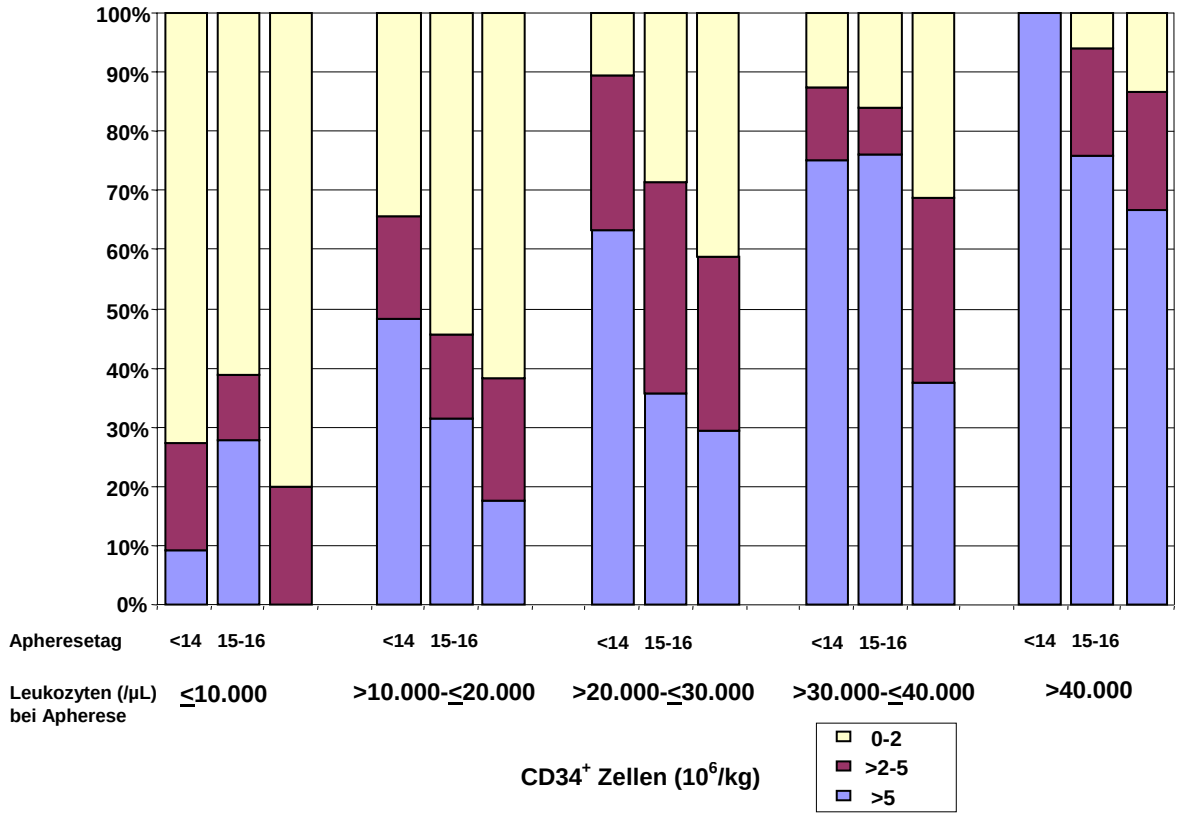

Abbildung 9: Verteilung der Sammelergebnisse unter Berücksichtigung der relativen Effizienz des Leukozytenwerts bei Apherese.

Hierfür wurde eine zusätzliche Subkategorisierung (Apheresetag ≤14, 15-16, >16) innerhalb der Leukozytenkategorien eingeführt. Dies führt zu einer weiteren Aufgliederung der erzielten Stammzellausbeuten. Je früher ein bestimmter Leukozytenwert im Blut erreicht wird, desto höher ist auch die gewinnbare Stammzellmenge.

4 DISKUSSION

Die Definition des optimalen Zeitraums der Stammzellmobilisierung ist die zentrale Voraussetzung für eine effiziente Stammzellsammlung aus dem peripheren Blut durch Leukapherese. Hierdurch kann die gesammelte Stammzellmenge optimiert und die Anzahl der Apheresen begrenzt werden. Bei Lymphomen und multiplem Myelom wird heutzutage meistens die Kombination aus Chemotherapie und hämatopoetischem Wachstumsfaktor für die Stammzellmobilisierung eingesetzt. Viele Zentren orientieren sich am Wiederanstieg der Leukozyten nach dem chemotherapieinduzierten Nadir, um die Stammzellsammlungen zu beginnen. Der Stellenwert der Leukozytenzahl zur Vorhersage der Sammelergebnisse ist jedoch nur begrenzt definiert. In dieser Arbeit wurde die Effektivität der Stammzellsammlung bei 101 Patienten mit Lymphom und multiplem Myelom, die eine IEV-Chemotherapie mit anschließender G-CSF Gabe erhielten, und der prädiktive Wert der Leukozytenzahl vor Apherese für das Sammelergebnis untersucht.

Mit dem in dieser Arbeit untersuchten IEV-Regime mit G-CSF wurden meistens sehr vorteilhafte Sammlungsergebnisse erzielt. Im IEV-Regime sind die Substanzen Ifosfamid, Epirubicin und VP-16 in einer deutlich myelosuppressiven Dosierung

miteinander kombiniert, so dass auch unabhängig von Stammzellsammlungen G-CSF zur Reduktion der Neutropeniedauer eingesetzt werden muss. Die günstige Zusammensetzung des IEV-Regimes mit G-CSF zur Mobilisierung wird durch die Daten anderer Gruppen unterstützt. Die Kombination von myelosuppressiver Chemotherapie mit einem hämatopoetischem Wachstumsfaktor führt zu besseren Sammelergebnissen, als der Einsatz von Chemotherapie und Wachstumsfaktor alleine (Lie et al., 1996). Der Einsatz von G-CSF als hämatopoetischen Wachstumsfaktor im Vergleich mit GM-CSF führt zu besseren Sammelergebnissen nach Chemotherapie (Weaver et al., 2000). Eine relevante Myelosuppression durch eine entsprechend intensive Chemotherapie wirkt sich förderlich auf die Sammlungsergebnisse aus (Lie et al., 1996). Die Kombination der Substanzen Ifosfamid, Epirubicin und VP-16 erwies sich als effektive Zusammensetzung der Chemotherapie für die Mobilisierung (Moskowitz et al., 1999; McQuacker et al., 1997; Engelhardt et al., 1997).

In der Anfangsphase der Stammzellgewinnung aus dem Blut durch Leukapherese wurden die Stammzellapheresen frühzeitig begonnen, wenn der Leukozytenwert im Blut über 1000 Leukozyten / μL anstieg (Gianni et al., 1989; Craig et al. 1993), um

die Stammzellmobilisierung nicht zu verpassen. Es zeigte sich jedoch mit zunehmender Erfahrung, dass bessere Stammzellausbeuten bei höheren Leukozytenwerten zu erwarten sind. In einer Studie konnten an über 50 Patienten mit hochmalignem Non-Hodgkin-Lymphom ausreichende Sammelergebnisse nach VAPEC-B Chemotherapie und G-CSF erzielt werden, wenn die Apheresen zwischen 3000 und 10000 Leukozyten / µL begonnen wurden (Pettengell et al. 1993). In einer Arbeit von Jones und Mitarbeitern, in der die Stammzellmobilisierung bei 26 Patienten mit Lymphom nach Gabe von Cyclophosphamid in einer Dosierung von 1,5 g/m^2 untersucht wurde, wurde als optimaler Zeitpunkt für den Beginn der Stammzellapheresen ein Leukozytenwert über 8000/µL definiert (Jones et. al., 1994). Die Stammzellapheresen in unserer Serie wurden begonnen, wenn nach Überwindung der Myelosuppression die Leukozyten unter G-CSF auf 5000-10000/ µl angestiegen waren. In der Regel wurden 2 - 3 Stammzellapheresen an aufeinanderfolgenden Tagen bei steigenden Leukozytenwerten durchgeführt. Die insgesamt erzielten vorteilhaften Sammelergebnisse bestätigten diese Strategie.

Bei der Beurteilung des Sammelergebnisses erfolgte ein Vergleich mit Zielgrößen. Eine Dosis von 2,0 - 2,5 x 10^6 $CD34^+$ Zellen / kg Körpergewicht wird entsprechend

der Erfahrungen als ausreichend und sicher für die autologe Transplantation angesehen und ist in den meisten Protokollen zur Blutstammzelltransplantation als Standarddosis angegeben. (Alcorn et al. 2000; Corso et al. 2000; Schwella et al. 1996; Bensinger et al. 1995; Haas et al. 1994; Bensinger et al. 1994). Hierdurch wird in den meisten Fällen eine Regeneration der Neutrophilenzahl (>500 / μL) und Thrombozytenzahl (>20000 / μL) innerhalb von zwei Wochen erreicht. Bei einer Dosis von 5 x 10^6 $CD34^+$ Zellen / kg oder darüber, was derzeit als optimale Stammzelldosis betrachtet wird, kann die Neutrophilen- und Thrombozytenregeneration auf minimal 8-9 Tage reduziert sein (Weaver et al. 1995). Mit einer einzigen Apherese wurden in 65 % der Stammzellsammlungen mindestens 2 x 10^6 $CD34^+$Zellen/kg erhalten und in 45 % mindestens 5 x 10^6 $CD34^+$Zellen/kg. Da bei den Patienten mehr als eine Apherese die Regel war, konnte bei fast allen Patienten zumindest eine ausreichende Stammzellmenge für eine Transplantation erzielt werden. Bei Lymphomen wird heutzutage in der Regel eine singuläre autologe Stammzelltransplantation durchgeführt (Bastion et al. 1995; Freedman et al. 1996; Philip et al. 1995), beim multiplen Myelom dagegen wird häufig eine Tandem-Hochdosistherapie mit zweifacher autologer Stammzelltransplantation angewandt

(Barlogie et al. 1997; Barlogie et al. 1999, Palumbo et al. 1999). Deswegen sind gerade beim multiplen Myelom hohe Stammzellausbeuten erforderlich, die mit IEV-Chemotherapie und G-CSF erzielt werden können. Da unser Patientenkollektiv sowohl Lymphom-Patienten als auch Patienten mit multiplem Myelom umfasste, konnte geprüft werden, ob auch die Art der Erkrankung eine Auswirkung auf die Stammzellmobilisierung hat. Daher wurde in beiden Diagnosegruppen das Ausmaß der Stammzellausbeute verglichen. Tatsächlich zeigten sich etwas höhere Sammelergebnisse beim multiplen Myelom. Dieser Trend ist vermutlich durch ein etwas geringeres Ausmaß an Vorbehandlung bedingt.

Die maximale Stammzellausschüttung fällt in den Zeitraum des exponentiellen Leukozytenanstieges nach dem Nadir. In der Arbeit von Pettengell et al. (1993) verlief die Kurve der Stammzellmobilisierung aus dem Knochenmark in das periphere Blut parallel zum Leukozytenanstieg und war um etwa 24 Stunden gegenüber dem Leukozytenanstieg zeitlich nach hinten verschoben. In dieser Arbeit fand sich zwischen der Leukozytenzahl vor Apherese und dem erzielten CD34-Sammelergebnis ein hochsignifikanter Zusammenhang ($p<0,001$). Mit steigender Leukozytenzahl wurden höhere Stammzellausbeuten erreicht. In einer Untersuchung

der Stammzellsammlung bei 190 Patienten mit multiplem Myelom nach Mobilisierung mit Cyclophosphamid, Prednison und G-CSF zeigte sich, dass es vorteilhafter ist, die Apheresen beim Leukozytenanstieg, der zeitlich variabel erfolgt, zu beginnen, als an einem festgelegten Sammlungstag. Bei variablem Sammlungsbeginn konnte das Sammelergebnis im Vergleich mit einem fixierten Sammlungstag um 115% gesteigert werden (Krieger et al. 1999). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit unserer Studie.

Im Weiteren wurde festgestellt, dass der prädiktive Wert der Leukozytenzahl vor Apherese auch vom Apheresetag abhängt. Mittels einer Formel ließ sich eine relative Effizienz des Leukozytenwerts für den jeweiligen Apheresetag berechnen. Daß das Sammelergebnis auch vom Zeitpunkt des Wiederanstiegs der Leukozyten nach dem Nadir abhängt, wurde auch von anderen Gruppen beobachtet. Bei einem frühen Wiederanstieg der Leukozyten auf >1000 / μL innerhalb von 10 Tagen wurden signifikant höhere CD34-Werte im peripheren Blut und im Aphereseprodukt erreicht, als bei Patienten, die >1000 Leukozyten/μL erst nach 10 Tagen oder mehr erreichten (Williams et al., 1998). Ein relativer Effizienzfaktor, so wie er in dieser Arbeit errechnet wurde, ist bislang jedoch nicht beschrieben worden. Aus den charakterisierten Abhängigkeiten der Stammzellausbeute vom Leukozytenwert vor

Apherese und ebenso vom Apheresetag wurde ein prädiktives Modell entwickelt. In diesem Modell wurde die Stammzellausbeute anhand von Kategorien der Leukozytenwerte definiert. Zusätzlich wurde als weitere Unterteilung eine Stratifizierung innerhalb der Kategorie nach dem Apheresetag durchgeführt. Auf diese Weise kann die Stammzellausbeute auf einfache Weise bereits vor der Durchführung der Leukapherese vorhergesagt werden. Dies ist von praktischer Relevanz, da beide in das Modell eingehende Parameter entweder schnell zu bestimmen oder vor Apherese bereits bekannt sind.

Es gibt einige Studien, in denen der Leukozytenwert als prädiktiver Faktor für die Apherese in Frage gestellt wird. Diese Autoren beschreiben eine schlechte Korrelation zwischen dem Leukozytenwert vor Apherese und dem CD34- und CFU-GM Wert im peripheren Blut vor Apherese (Siena et al., 1991; Hansson et al., 1995). Es ist unwahrscheinlich, dass die von unseren Daten differierenden Ergebnisse auf der Tatsache beruhen, dass in diesen Studien der Leukozytenwert mit den CD34-Werten im peripheren Blut verglichen wurden, statt mit den CD34-Sammelergebnissen im Aphereseprodukt, da CD34-Werte im peripheren Blut bekanntlich stark mit den CD34-Sammelergebnissen korreliert sind. So beschreiben

z. B. Knudsen et al. eine schlechte Korrelation zwischen dem Leukozytenwert vor Apherese und dem CD34-Wert im Aphereseprodukt (Knudsen et al. 1998). In dieser Studie wurden allerdings verschiedene, in ihrer Zusammensetzung unterschiedliche Mobilisierungsregime verwendet. Die verschieden angewandten Zytostatika und die unterschiedliche Intensität der Chemotherapie besitzen wahrscheinlich einen Einfluss auf den prädiktiven Wert der Leukozytenzahl vor Apherese und können so die differierenden Ergebnisse erklären. In unserer Studie allerdings wurde eine einheitliche Stammzellmobilisierung untersucht.

Neben der Orientierung am Leukozytenwert kann auch die Anzahl der $CD34^+$ Zellen im Blut vor Apherese zur Beurteilung der Mobilisierung durchflußzytometrisch gemessen werden. In einer ganzen Reihe von Studien zeigte sich eine enge Korrelation zwischen dem am Tag der Apherese gemessenen CD34-Wert und dem CD34-Gehalt des Aphereseproduktes (Remes et al., 1997; Perez-Simon et al., 1998; Knudsen et al., 1998; Schwella et al., 1996; Elliott et al., 1996; Alcorn et al., 2000). So kann von der $CD34^+$ Zellzahl im Blut sehr genau auf die später im Sammelprodukt enthaltene $CD34^+$ Zellmenge geschlossen werden. Allerdings stellt der CD34-Wert im peripheren Blut nur eine Momentaufnahme der Stammzellmobilisierung dar,

während die Leukozytenwerte auch Aufschluss über die Phase der Mobilisierung geben. Nachteilig an der CD34 Messung ist auch, dass die Bestimmung relativ zeit- und kostenaufwendig ist und das Ergebnis aufgrund der Bestimmungszeit von etwa 3 Stunden am Morgen der möglichen Apherese zunächst nicht zur Verfügung steht. Im Regelfall ist auch eine ganz präzise Vorhersage für die Planung nicht erforderlich. Letztendlich ist die tatsächlich gesammelte Stammzellmenge ausschlaggebend, die im Produkt gemessen wird. Bei besonderen Umständen mit fraglicher Mobilisierung kann eine CD34-Messung im Blut jedoch sehr hilfreich sein.

Eine maschinelle Leukozytenzählung aus dem peripheren Blut ist an Krankenhäusern innerhalb von 15-30 Minuten verfügbar und mit geringen Kosten verbunden. Mit Hilfe des hier erarbeiteten Modells kann entschieden werden, ob sich eine Apherese für diesen Tag lohnt oder nicht und es kann abgeschätzt werden, wie viele Apheresen erforderlich sein werden, um für die geplante Hochdosistherapie ausreichend Stammzellen zur Verfügung zu haben. Dies verbessert Effizienz und Planbarkeit der Stammzellsammlungen. Unnötige Apheresen, die eine Belastung für den Patienten darstellen, können vermieden werden. Dieses Modell hat sich zu

einem wertvollen Instrument für die Stammzellgewinnung an unserer Klinik entwickelt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Hochdosistherapie mit autologer Blutstammzelltransplantation besitzt einen gesicherten Stellenwert bei rezidivierten Lymphomen und multiplem Myelom. In dieser Arbeit wurde bei 101 Patienten die Stammzellsammlung aus dem Blut mit Leukapherese nach IEV-Chemotherapie und unter G-CSF Gabe untersucht und der prädiktive Wert der Leukozytenzahl vor Apherese für das Sammelergebnis bestimmt.

Untersucht wurden insgesamt 307 Stammzellsammlungen. Pro Patient wurden im Median 3 (Bereich 1-8) Apheresen durchgeführt. Der Leukozytenwert vor Apherese lag im Median bei 22.300 Leukozyten/µL (Bereich 2.500-89.000/µL). Mit einer einzelnen Stammzellapherese konnten im Median 4,32 (Bereich 0,01-40,87) x 10^6 $CD34^+$Zellen/kg gesammelt werden. Für die autologe Stammzelltransplantation ausreichende 2 x 10^6 $CD34^+$Zellen/kg wurden bei 199 von 307 Apheresen (65 %) mit einer einzigen Apherese gewonnen. Eine optimierte Stammzelldosis von 5 x 10^6 $CD34^+$Zellen/kg ergab sich bei 139 von 307 Apheresen (45 %). Es zeigte sich ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen der Leukozytenzahl im Blut vor Apherese und dem Sammelergebnis. Bei höheren Leukozytenwerten im Blut wurden

signifikant bessere Stammzellausbeuten erzielt ($p < 0,001$). Als zweite Abhängigkeit ließ sich eine relative Effizienz des Leukozytenwerts für das Sammelergebnis bestimmen, die mit zunehmenden Zeitintervall ab Beginn der Mobilisierungschemotherapie kontinuierlich abnahm ($p = 0,0004$). Beide charakterisierten Abhängigkeiten ließen sich in einem prädiktiven Modell vereinen, dass neben der Leukozytenzahl im Blut eine Stratifizierung nach dem Apheresetag verwendet. Auf diese Weise kann das Sammelergebnis ohne vorherige Stammzellmessung im Blut in der Regel ausreichend genau vorhergesagt werden.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass effektive Stammzellsammlungen nach IEV-Chemotherapie und G-CSF-Gabe bei Patienten mit Lymphom und multiplem Myelom möglich sind und sich die erzielten Sammelergebnisse mit einem einfachen prädiktiven Modell vorhersagen lassen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Attal M, Huguet F, Schlaifer D (1992). Intensive combined therapy for previously untreated aggressive myeloma. Blood, 79: 1130-1136.

Attal M, Harrousseau J-L, Stoppa A-M et al. (1996). A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. N Engl J Med, 335: 91-97.

Alcorn MJ, Farrell E, Barr J et.al. (2000). The number of $CD34^+$ cells mobilized into the peripheral blood can predict the quality of subsequent collections. J Hematother Stem Cell Res., 9: 89-93.

Barlogie B, Jagannath S, Vesole DH et al. (1997). Superiority of tandem autologous transplantation over standard therapy for previously untreated multiple myeloma. Blood, 89: 789-793.

Barlogie B. et al. (1999). Total therapy with tandem transplants for newly diagnosed multiple myeloma. Blood, 93: 55-65.

Bastion et al. (1995). Intensive therapy with peripheral blood progenitor cell transplantation in 60 patients with poor-prognosis follicular lymphoma. Blood, 86: 3257-3262.

Bensinger WI, Longin K, Appelbaum F et al. (1994). Peripheral blood stem cells (PBSCs) collected after recombinant granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF): An analysis of factors correlating with the tempo of engraftment after transplantation. Br J Haematol. 87: 825-831.

Bensinger WI, Appelbaum F, Rowly S et al. (1995). Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells. J Clin Oncol, 13: 2547-2555.

Beyer J, Schwella N, Zingsem J et al. (1995). Hematopoietic rescue after high-dose chemotherapy using autologous peripheral-blood progenitor cells or bone marrow: A randomized comparison. J Clin Oncol; 13: 1328-35.

Brice P, Marolleau JP, Pautier P et al. (1996). Hematologic recovery and survival of lymphoma patients after autologous stem-cell transplantation: Comparison of bone marrow and peripheral blood progenitor cells. Leukemia and Lymphoma, 22; 449-456.

Brunvand MW, Bensinger WI, Soll E et al. (1996). High-dose fractionated total-body irradiation, etoposide and cyclophosphamide for treatment of malignant lymphoma: comparison of autologous bone marrow and peripheral blood stem cells. Bone Marrow Transplantation, 18: 131-141.

Cavin JA, Scheer SC, Thomas ED et al. (1964).The recovery of lethally irradiated dogs given infusions of autologous leukocytes preserved at -80 C. Blood, 23: 38-43.

Corso A, Caberlon S, Pagnucco G et. al. (2000). Blood stem cell collections in multiple myeloma: definition of a scoring system. Bone marrow transplant. 26, 283-286.

Craig et al. (1993). Peripheral blood stem cell mobilization using high-dose cyclophosphamide and G-CSF in pretreated patients with lymphoma. Br J Haematol, 85: 210-212.

Cunningham D, Paz-Arez L, Milan S et al. (1994). High-dose melphalan and autologous bone marrow transplantation as consolidation in previously untreated myeloma. J Clin Oncol, 12: 759-763.

Demirer T, Buckner CD, Gooley T et al. (1996). Factors influencing collection of peripheral blood stem cells in patients with multiple myeloma. Bone Marrow Transplantation, 17: 937-941.

Demirer T, Buckner CD, Storer B et al. (1997). Effect of different chemotherapy regimens on peripheral-blood stem-cell collections in patients with breast cancer receiving granulocyte-stimulating factor. J Clin Oncol, 15: 684-690.

Dreger P, Klöss M, Petersen B et al. (1995). Autologous progenitor cell transplantation: Prior exposure to stem cell-toxic drugs determines yield and engraftment of peripheral blood progenitor cell but not of bone marrow grafts. Blood, 86: 3970-3978.

Elliott et al. (1996). When to harvest peripheral-blood-stem cells after mobilization therapy: Prediction of CD34-positive cell yield by preceding day CD34-positive concentration in peripheral blood. J Clin Oncol, 14 (3): 970-973.

Engelhardt et al. (1997). Blood progenitor cell (BPC) mobilization studied in multiple myeloma, solid tumor and non-Hodgkin´s lymphoma patients after combination chemotherapy and G-CSF. Bone Marrow Transplantation, 19: 529-537.

Freedman et al. (1996). High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation in patients with follicular lymphoma during first remission. Blood, 88: 2780-2786.

Gianni AM, Siena S, Bregni M et al. (1989). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haemopoietic stem cells for autotransplantation. Lancet, 8663: 580-585.

Gianni AM (1994). Where do we stand with respect to the use of peripheral blood progenitor cells? Annals of Oncology, 5: 781-784.

Goodman JW, Hodgson GS (1962). Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. Blood, 19: 702-14.

Gordon MY, Clarke D, Atkinson J et al. (1990). Hemopoietic progenitor cell binding to the stromal microenvironment in vitro. Experimental Hematology, 18: 837-842.

Haas R, Hohaus S, Egerer G (1992). Recombinant human granulocyt-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) subsequent to chemotherapy improves collection of blood stem cells for autografting in patients not eligible for bone marrow harvest. Bone Marrow Transplantation, 9: 459-65.

Haas R, Möhle R, Fruehauf S et. al. (1994). Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma. Blood, 83: 3787-3794.

Hansson M, Svensson A, Engervall P et al. (1995). Increase of monocytes predicts mobilization of peripheral stem and progenitor cells after chemotherapy followed by G-CSF administration. Eur J Haematol, 54: 321-328.

Hartmann O, Gaelle Le Corroller A, Blaise D et al. (1997). Peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation for solid tumors and lymphomas: Hematologic recovery and costs. Ann Intern Med, 126: 600-607.

Henon Ph R, Liang H, Beck-Wirth G et al. (1992). Comparison of hematopoietic and immune recovery after autologous bone marrow or blood stem cell transplants. Bone Marrow Transplantation; 9: 285-91.

Jones HM, Jones SA, Watts MJ (1994). Development of a simplified single-apheresis approach for peripheral-blood progenitor-cell transplantation in previously treated patients with lymphoma. J Clin Oncol, 12: 1693-1702.

Juttner CA, To LB, Haylock DN (1985). Circulating stem cells collected in very early remission from acute non-lymphoblastic leukemia produce prompt but incomplete hematopoietic reconstitution after high dose melphalan or supralethal chemoradiotherapy. Br J Haematol, 61: 739-45.

Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD et al. (1986). Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryopresserved circulating stem cells. Exp. Hematology, 14: 192-96.

Knudsen LM, Gaarsdal E, Jensen L et al. (1998). Evaluation of mobilized CD34+ cell counts to guide timing and yield of large-scale collection by leukapheresis. J Hematother, 7: 45-52.

Körbling M, Fliedner TM, Pflieger H (1980). Collection of large quantities of granulocyte/macrophage progenitor cells (CFUc) in man by means of Continuous-Flow Apheresis. Scand J Haematol, 24: 22-28.

Körbling M, Dörken B, Ho AD et al. (1986). Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with burkitt`s lymphoma. Blood, 67: 529-32.

Krieger MS, Schiller G, Berenson JR et.al. (1999). Collection of peripheral blood progenitor cells (PBPC) based on rising WBC and platelet count significantly increases the number of CD34-cells. Bone Marrow Transplant., 24: 25-28.

Liberti G, Pearce R, Taghipour G et al. (1994). Comparison of peripheral blood stem-cell and autologous bone marrow transplantation for lymphoma patients: A case-controlled analysis of the EBMT Registry data. Annals of Oncology, 5 (Suppl 2): 151-153.

Lie et al. (1996). Progenitor cell yield in sequential blood stem cell mobilization in the same patients: Insights into chemotherapy dose escalation and combination of haemopoietic growth factor and chemotherapy. Br J Haematol, 95: 39-44.

Majolino I, Pearce R, Taghipour G et al. (1995). PBSCT vs. ABMT in Hodgkin`s and non-Hodgkin`s lymphomas: A new matched-pair analysis of the EBMT registry data. Bone Marrow Transplant, 15: 162.

McCredie KB, Hersh EM, Freireich EJ (1971). Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. Science, 171: 293-4.

McElwain TJ, Powles RL (1983). High-dose intravenous melphalan for plasma-cell leukemia and myeloma. Lancet, 8354: 822-824.

McQuaker IG, Haynes AP, Stainer C et al.,(1997). Stem cell mobilization in resistant or relapsed lymphoma: superior yield of progenitor cells following a salvage regimen comprising ifosphamid, etoposide and epirubicin compared to intermediate-dose cyclophosphamide. Br J Haematol, 98: 228-233.

Moskowitz et al. (1999). Ifosfamide, carboplatin and etoposide: A highly effective cytoreduction and peripheral-blood progenitor-cell mobilization regimen for transplant-eligible patients with non-Hodgkin‘s lymphoma. J Clin Oncol, 17 (12): 3776-3785.

Negrin RS, Claus R et al. (1995). Transplantation of enriched and purged peripheral blood progenitor cells from a single apheresis product in patients with non-Hodgkin´s lymphoma. Blood, 85: 3334-41.

Palumbo et al. (1999). Dose-intensive Melphalan with stem cell support (Mel100) is superior to standard treatment in elderly myeloma patients. Blood, 94: 1248-1253.

Perez-Simon JA, Caballero MD, Corral M et al. (1998). Minimal number of circulating CD-34+cells to ensure successful leukapheresis and engraftment in autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. Transfusion, 38: 385-390.

Pettengell R, Testa NG, Swindell R et al (1993). Transplantation Potential of hematopoietic cells released into the circulation during routine chemotherapy for non-Hodgkin´s lymphoma. Blood, 82: 2239-48.

Pettengell R (1995). Expanding the role of blood progenitor cells. Annals of Oncology, 6: 759-767.

Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A et al. (1995). Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin`s lymphoma. New England Journal of Medicine, 333: 1540-1545.

Reiffers J, Bernard P, David B et al. (1986). Successful autologous transplantation with peripheral blood hemopoietic cells in a patient acute leukemia. Exp. Hematology, 14: 312-15.

Remes K, Matinlauri I, Grenman S et al. (1997). Daily measurements of blood CD-34 cells after stem cell mobilization predict stem cell yield and posttransplant hematopoietic recovery. J. Hematother, 6: 13-19.

Richman CM, Weiner RS, Yankee RA (1976). Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. Blood, 47: 1031-9.

Rosenfeld CS, Gremba C, Shadduck RK et al. (1994). Engraftment with peripheral blood stem cells using noncontrolled-rate cryopreservation: comparison with autologous bone marrow transplantation. Exp Hematology; 22: 290-294.

Russell NH, Pacey S (1992). Economic evaluation of peripheral blood stem cell transplantation for lymphoma. Lancet, 340: 1290.

Schmitz N, Linch DC, Dreger P et al. (1996). Randomised trial of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone-marrow transplantation in lymphoma. Lancet, 347: 353-357.

Schwella et al. (1996). Impact of preleukapheresis cell counts on collection results and correlation of progenitor-cell dose with engraftment after high-dose chemotherapy in patients with germ cell cancer. J Clin Oncol, 14 (4): 1114-1121.

Sheridan WP, Begley CG, Juttner CA et al. (1992). Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilized by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. Lancet; 339: 640-4.

Siena S, Bregni M, Brando B et al. (1991). Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. Blood, 77: 400-409.

Simmons PJ, Masinovsky B, Longenecker BM (1992). Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. Blood, 80: 388-395.

Smith TJ, Hillner BE, Schmitz N et al. (1997). Economic analysis of a randomized clinical trial to compare filgrastim-mobilized peripheral-blood progenitor-cell transplantation and autologous bone marrow transplantation in patients with Hodgkin`s and non-Hodgkin`s lymphoma. J Clin Oncol, 15: 5-10.

Socinski MA, Elias A, Schnipper L et al (1988). Granulocyte- macrophage colony stimulating factor expands the circulating hematopoietic progenitor cell compartment in man. Lancet, 8596: 1194.

To LB, Roberts MM, Haylock DN et al (1992). Comparison of hematological recovery times and supportive care requirements of autologous recovery phase peripheral blood stem cell transplants, autologous bone marrow transplants and allogenic bone marrow transplants. Bone Marrow Transplantation, 9: 277-84.

Tricot G, Jagannath S, Vesole D (1995). Peripheral blood stem cell transplants for multiple myeloma: Identification of favorable variables for rapid engraftment in 225 patients. Blood, 85: 588-596.

Udomsakdi C, Lansdorp PM, Hogge DE et al (1992). Characterization of primitive hematopoietic cells in normal human peripheral blood. Blood, 80: 2513-2521.

Watts MJ, Sullivan AM, Jamieson E et al (1997). Progenitor cell mobilization after low-dose Cyclophosphamide and Granulocyte Colony-Stimulating Factor: An Analysis of progenitor-cell quantity and quality and factors predicting for these parameters in 101 pretreated patients with malignant lymphoma. J Clin Oncol, 15: 535-546.

Weaver CH, Hazelton B, Birch R (1995). An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy. Blood, 86: 3961-3969.

Weaver et al. (2000). Randomized trial of filgrastim, Sargramostim or sequential sargramostim and filgrastim after myelosuppressive chemotherapy for the harvesting of peripheral-blood stem cells. J Clin Oncol, 18 (1): 43-53.

Williams O, Demirer T, Lilleby K et al. (1998). Tempo of hematologic recovery correlates with peripheral blood CD34+ cell level in patients undergoing stem cell mobilization. J Clin Apheresis, 13: 1-6.

LEBENSLAUF

Angaben zur Person

Name:	Christine Herzog, geb. von Osten
Geburtsort:	Ludwigshafen/Rhein
Geburtsdatum:	30. 01. 1971
Familienstand:	verheiratet mit Dr. med. Christopher Herzog 2 Kinder: Charlotte (3J.) & Maximilian (1J.)
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung

1977 - 1981	Grundschule an der Waldlehne / Essen
1981 - 1990	Grashof - Gymnasium / Essen
1990	Abitur

Ausbildung

1990 – 1992	Staatliche Ausbildung für technische Assistenten in der Medizin (Labor)

Medizinstudium

1993 -1995	Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
03/1995	Ärztliche Vorprüfung
1995/1999	Ludwig-Maximilians-Universität, München
03/1996	1. Staatsexamen
03/1998	2. Staatsexamen
1998 - 1999	Praktisches Jahr (Klinikum Großhadern, LMU München / Broussais-Hôtel Dieu, Université de Paris)
11/1999	3. Staatsexamen

6.1.1.1 Berufliche Tätigkeit

seit 05/2000	AIP in Pneumologie/Allergologie, 2. Klinik für Innere Medizin der Johann Goethe Universität Frankfurt (Dir.: Prof. Dr. T. O. F. Wagner) *- derzeit unterbrochen durch Erziehungsurlaub -*

Meine Danksagung gilt vor allem Herrn PD Dr. Christian Straka, Oberarzt der……, der mich mit außerordentlichem Bemühen und persönlichem Einsatz durch die Jahre der Arbeit begleitete. Er führte mich in das wissenschaftliche Arbeiten ein und war mir stets durch sein offenes Ohr für Sachfragen jeglicher Art ein vorbildhafter Mentor. Ich danke ihm für die Bereicherung, die mein Studium hierdurch erfuhr.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. B. Emmerich, Leiter der Hämato-Onkologie der Medizinischen Klinik Innenstadt, der mir die Möglichkeit gab, bei Ihm zu promovieren.

Großer Dank gilt auch Frau Brigitte Schnabel, die mir zu jeder Zeit hilfreich zur Seite stand und vor allem nach meinem Umzug nach Frankfurt mit großem Einsatz half, die Arbeit trotz der räumlichen Distanz zu Ende stellen zu können.