

Aus der Klinik für Innere Medizin II

Mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie

Sektion für Stammzell- und Immuntherapie

(Leiter: Prof. Dr. med. M. Gramatzki)

im Universitätsklinikum Schleswig–Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Knochenmarkstammzelltransplantate:

Retrospektiver Vergleich qualitätsbestimmender Parameter zwischen unmanipulierten und erythrozytendepletierten Produkten aufgrund AB0-Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Sarah Schill

aus Eberswalde

Kiel (2016)

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Humpe, Sektion für Stammzell- und Immuntherapie,
II. Med. Klinik
2. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Wesch, Institut für Immunologie

Tag der mündlichen Prüfung: 08.05.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 31.01.17

gez.: Prof. Dr. J. Roeder

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Meiner Mama Christine Schill

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	7
1.1	Bluthomöostase und hämatopoietische Stammzellen im Knochenmark	7
1.2	Charakterisierung und Selektion hämatopoietischer Stammzellen	8
1.3	Transplantationsindikationen und Quellen hämatopoietischer Stammzellgewinnung	9
1.4	Knochenmarktransplantation	10
1.4.1	Allgemeine Voraussetzungen effizienter Transplantationen.....	12
1.4.2	AB0-Konstellation zwischen Spender und Empfänger	13
1.4.3	Graft-Manipulation	16
1.4.4	Immunregeneration und Engraftment.....	16
1.4.5	Komplikationen nach allogener Knochenmarktransplantation	17
1.5	Fragestellung der Arbeit.....	19
2	Patienten, Materialien und Methoden.....	20
2.1	Patientenkollektiv:.....	20
2.2	Datenerfassung	20
2.3	Statistische Methodik	21
3	Ergebnisse	22
3.1	Alters- und Geschlechterverteilung.....	22
3.2	AB0-Konstellationen zwischen Spender und Empfänger	22
3.3	Volumen der Knochenmarkspenden vor der Verarbeitung.....	23
3.4	Knochenmarkvolumina vor und nach der Verarbeitung	23
3.5	Wirkstoffgehalt der CD34-positiven Zellen vor und nach Knochenmarkverarbeitung	24
3.6	Gehalt der nukleären Zellen im Produkt vor und nach Knochenmarkverarbeitung	24
3.7	Recovery der verschiedenen transplantationspezifischen Zellpopulationen	25
3.8	Daten zum Hämatokrit in den Knochenmarkprodukten	25
3.9	Daten zum Erythrozytenvolumen in den Knochenmarkprodukten.....	26
3.10	Erythrozytenvolumen je kg Körpergewicht und Erythrozyten- depletionseffizienz	27
3.11	Leukozytenengraftment post transplantationem (Leukozyten >1/nl an drei aufeinanderfolgenden Tagen)	27
3.12	Thrombozytenengraftment post transplantationem (Thrombozyten > 20/nl)	28

4	DISKUSSION	29
4.1	Diskussion der Methodik	29
4.2	AB0-Konstellation zwischen Spender und Empfänger.....	30
4.3	Knochenmarkvolumen vor und nach Verarbeitung	31
4.4	Wirkstoffgehalt der nukleären und der CD34-positiven Zellen im Transplantat.....	32
4.5	Erythrozytenvolumen und Hämatokritwerte	34
4.6	Transplantatengraftment.....	35
5	ZUSAMMENFASSUNG	37
6	LITERATUR.....	39
7	ANHANG.....	46
7.1	Abb. 1: Altersverteilung der Empfänger in den Gruppen	46
7.2	Abb. 2: Knochenmarkvolumina vor weiterer Verarbeitung.....	47
7.3	Abb. 3: Knochenmarkvolumina vor/nach Verarbeitung	48
7.4	Abb. 4: Wirkstoffgehalt CD 34-positiver Zellen vor/nach Verarbeitung	49
7.5	Abb. 5: Wirkstoffgehalt NC vor/nach Verarbeitung	50
7.6	Abb. 6: Daten zur Recovery der verschiedenen Wirkstoffe.....	51
7.7	Abb. 7: Daten zum Hämatokrit (HKT) in den Produkten	52
7.8	Abb. 8: Daten zum Erythrozytenvolumen in den Knochenmark-produkten	53
7.9	Abb. 9.1 und 9.2: Daten zum Erythrozytenvolumen/kg und der Erythrozyteneffizienz nach erfolgter Verarbeitung	54
7.10	Abb. 10: Daten zum Engraftment (Leukozyten > 1000, an 3 Tagen).....	55
7.11	Abb. 11: Daten zum Engraftment (Thrombozyten > 20/nl).....	56
	DANKSAGUNG.....	57
8	LEBENS LAUF.....	58

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigenpräsentierende Zellen
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Cytomegalie Virus
EBMT	The European Group for Blood and Marrow Transplantation
GvHD	Graft-versus-Host- Disease (Spender gegen Wirt Erkrankung)
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor (Granulozyten-Kolonie-stimulierender- Faktor)
HKT	Hämatokrit
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HSC	Hematopoietic stem cells (Hämatopoietische Stammzellen)
HSZT	Transplantation hämatopoietischer Stamm- und Progenitorzellen
IQR	Bereich zwischen den Quartilen (Interquartilerange)
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
ml	Milliliter
n	Anzahl
nl	Nanoliter
NC	Nucleated Cells (Nukleäre Zellen)
o.g.	oben genannt
RKI	Robert-Koch-Institut
TBI	Total Body Irradiation (Ganzkörperbestrahlung)
ZfKD	Zentrum für Krebsregisterdaten
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Bluthomöostase und hämatopoietische Stammzellen im Knochenmark

Für die Aufrechterhaltung der Funktionsfähigkeit des menschlichen Organismus ist eine stetige Blutzellerneuerung und damit Einhaltung einer hämatologischen Homöostase unerlässlich (Rieger and Schroeder 2007). Die Lebensspanne der verschiedenen Zellen des blutbildenden Systems unterscheidet sich dabei erheblich und reicht von wenigen Stunden, wie im Fall der neutrophilen Granulozyten, bis hin zu durchschnittlich 120 Tagen bei den Erythrozyten. Die begrenzte Überlebensdauer der Blutzellen macht ihre kontinuierliche Neubildung von etwa $3,5 \times 10^{11}$ Zellen täglich notwendig (Dingli and Pacheco, 2010).

Die Blutzellzahl kann in bestimmten Situationen, wie beispielsweise bei Stress, Infektionen oder Blutverlust, erheblich gesteigert werden (Mueller-Eckhardt 2003). Der Ursprung dieser fortwährenden Zellregeneration des adulten blutbildenden Systems sind hämatopoietische Stammzellen (HSC), die im Knochenmark überwiegend in speziellen Mikrodomänen, den sogenannten Stammzellnischen, residieren. Diese Einheiten sind nicht als räumliche Dimensionen zu verstehen, sondern stellen vielmehr ein spezielles „Microenvironment“ der HSC dar, bestehend aus Stroma- und Endothelzellen sowie Osteoblasten und Adipozyten (Moore and Lemischka, 2006). Hier findet über verschiedene zellintrinsische und -extrinsische Mechanismen die Steuerung des Gleichgewichtes zwischen Differenzierung der Stammzellen und ihrer Selbsterneuerung statt (Schofield, 1978). Nach heutigem Erkenntnisstand wird angenommen, dass die extrazelluläre Matrix mittels löslicher Faktoren oder Zell-Zell-Kontakten (Dexter and Testa, 1976) an der Steuerung beteiligt ist, ob die Stammzellen in der Knochenmarknische verbleiben oder in die periphere Blutbahn wandern (Rieger and Schroeder, 2012).

HSC stellen multipotente Ursprungszellen der Hämatopoiese dar. Das heißt, neben ihrer Fähigkeit zur Differenzierung in alle Zellreihen des hämatopoietischen Systems, wie der Leuko-, Lympho-, Thrombo- und Erythrozytopoese, haben sie ebenfalls das Potential zur Proliferation.

Die Multipotenz von HSC wurde erstmals im Jahre 1909 durch den russischen Arzt Maximov postuliert. Hiermit legte er den Grundstein für den Leitgedanken der Etablierung einer Stammzelltransplantation bei malignen und nicht-malignen hämatologischen Erkrankungen.

1.2 Charakterisierung und Selektion hämatopoietischer Stammzellen

Die Stamm- und frühen hämatopoietischen Vorläuferzellen gehören im Knochenmark zur Gruppe der nukleären Zellen (NC). Sie sind nach histologischen Standardfärbungen in ihrer Morphologie nicht sicher voneinander zu unterscheiden.

Die gezielte Isolation, Differenzierung und Vermehrung der HSC *in vitro* erfordern jedoch ihre detaillierte Charakterisierung. Hierfür wurden seit Mitte der 1980er Jahre Oberflächenmarker in Form von zellspezifischen Antigenen klassifiziert, die eine genaue Identifizierung und damit zielgerichtete Isolierung der adulten Stammzellen ermöglichen (Alison et al., 2006, Loken et al., 1987).

Der Nachweis der Expression dieser Oberflächenantigene gelingt heutzutage mithilfe der Immunhistochemie und Durchflusszytometrie. Das erste Antigen, das auf der Oberfläche früher Formen von humanen HSC beschrieben wurde und als ihr phänotypischer Marker gilt, ist das membranständige Glykoprotein CD34 (Civin et al., 1984). Es wird auf pluri- und multipotenten Blutvorläuferzellen exprimiert und ermöglicht die Differenzierung zwischen den Vorläuferzellen und den daraus hervorgehenden ausgereiften Blutzellen (Berenson et al., 1988). Pluripotenz ist die Fähigkeit der Stammzellen, sich in nahezu alle Zelltypen der drei Keimblätter und Multipotenz die Fähigkeit, sich zu verschiedenen Zelltypen innerhalb eines Gewebes (z.B. Blutzellen) zu differenzieren.

Das Oberflächenantigen CD34 dient somit als Marker für die gezielte Isolation von Stammzellen und ermöglicht die numerische Bestimmung bzw. Manipulation der Zellen vor einer geplanten Transplantation (Bonnet, 2002). Über die genaue Funktion des CD34-Antigens ist bis heute allerdings wenig bekannt. Es wird lediglich vermutet, dass seine Expression eine wichtige Rolle bei der Stammzellretention in der oben beschriebenen Knochenmarknische spielt. Hämatopoietische Vorläuferzellen verlieren mit ihrer zunehmenden Differenzierung die CD34-Expression und verlassen schließlich als reife Blutzellen die Knochenmarknische, um in der peripheren Blutbahn zu zirkulieren (Narayan et al., 2005). Das Antigen CD34 findet man neben den HSC außerdem auf endothelialen Zellen und einigen Fibroblasten (Fina et al., 1990, Brown et al., 1991). Im Knochenmark sind etwa 0,5-3% der Zellen CD34-positiv. Jedoch stellt nur ein sehr geringer Anteil (1%) dieser Zellen die für die Transplantation benötigten multipotenten Stammzellen dar. Für die detailliertere Zuordnung der Linienzugehörigkeit dieser Zellen werden weitere auf ihrer Oberfläche koexprimierte Antigene herangezogen.

Hierzu gehört neben dem Antigen CD133 auch das Antigen CD45 (Gorgens et al. 2013). Sie sind weitere wichtige Marker bei der korrekten Bestimmung und Quantifizierung von HSC. Der Oberflächenmarker CD133 wird vor allem auf sehr frühen HSC mit einem hohen Selbsterneuerungspotential und einer niedrigen Apoptoserate exprimiert (Forraz et al. 2002). CD45 stellt einen Pan-Leukozytenmarker dar, dessen Expression in erster Linie abhängig vom Reifungszustand der Leukozyten ist. Mit zunehmender Leukozytenreife wird das Antigen stärker auf ihrer Oberfläche exprimiert. Thrombozyten und Erythrozyten sind CD45-negativ. Beim immunhistologischen Nachweis der CD34-positiven Leukozyten mit einer schwachen CD45-Koexpression handelt es sich mit einer hohen Wahrscheinlichkeit um die, für eine Transplantation benötigten HSC.

1.3 Transplantationsindikationen und Quellen hämatopoietischer Stammzellgewinnung

Auf der Basis von Daten epidemiologischer Krebsregister in Deutschland liegt die aktuelle Schätzung des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert-Koch-Institut (RKI) Berlin bezüglich der Inzidenz maligner hämatologischer Erkrankungen, wie z.B. der Leukämie oder einer lymphoproliferativen Erkrankung, bei jährlich etwa 25.000 Neuerkrankungen bundesweit (RKI Stand 2010).

Der Ursprung einer malignen hämatologischen Systemerkrankung kann dabei verschiedener Zellentität sein. Von der multipotenten hämatopoietischen Knochenmarkstammzelle über die Progenitorzellen bis hin zu den reifen Blutzellen im Knochenmark, dem peripheren Blut oder den Lymphknoten, können Blutzellen maligne entarten (Smith, 2003). Letztere, ausdifferenzierte Zellen haben die Fähigkeit der Proliferation verloren.

Eine abnorme und unkontrollierte Zellproliferation, wie zum Beispiel bei der akuten Leukämie mit einer klonalen Expansion entarteter Leukämienstammzellen (Tan et al., 2006), kann dabei die normalen Blutbestandteile und somit die Hämatopoese im Knochenmark immer weiter verdrängen und schließlich lebensbedrohlich einschränken. Je nach Risikostratifizierung aufgrund verschiedener Parameter, insbesondere aufgrund genetischer Aberrationen (Dohner et al., 2000), stellt für viele Patienten neben der alleinigen Chemotherapie die Stammzelltransplantation einen kurativen Therapieansatz dar (Horowitz and Rowlings, 1997).

Die stetig wachsenden wissenschaftlichen Erkenntnisse in der Medizin tragen zur fortwährenden Therapieoptimierung und Ausweitung der Indikationsstellung für die Transplantation hämatopoietischer Stamm- und Progenitorzellen (HSZT) bei.

Retrospektive Datenerhebungen zur Stammzelltransplantationsaktivität in Europa belegen einen kontinuierlichen Anstieg der Transplantationshäufigkeiten.

Wurden 1990 in Europa noch 4.432 HSZT durchgeführt (Gratwohl et al., 2002), so waren es im Jahre 2012 bereits 39.209 Fälle (43% allogene und 57% autologe) in insgesamt 658 Zentren in 48 europäischen Ländern (Gratwohl et al., 2013, Passweg et al., 2014, Passweg et al., 2015).

Für die Stammzellgewinnung gibt es drei mögliche Quellen (Korbling and Anderlini, 2001, Lie and To, 1997, Broxmeyer et al., 1990):

1. aus dem Knochenmark durch multiple Aspirationspunktionen, präferenziell im Bereich des hinteren Beckenkamms, in Vollnarkose mit einer Dauer von etwa einer Stunde
2. aus dem peripheren Blut mittels Leukozytapherese nach vorheriger G-CSF Mobilisationstherapie mit einer Dauer von etwa 3-5 Stunden, ohne Vollnarkose
3. aus dem Plazentarest- oder Nabelschnurblut mittels Nabelschnurpunktion nach abgeschlossenem Geburtsvorgang und anschließender Kryokonservierung bis zum Transplantationszeitpunkt

1.4 Knochenmarktransplantation

Die Geschichte der HSZT begann Ende des zweiten Weltkrieges. Ziel hierbei war die Etablierung einer wirksamen Behandlung gegen die Beeinträchtigung und Schädigung der Blutbildung aufgrund radioaktiver Strahlen nach den Atombombenabwürfen auf Hiroshima und Nagasaki. Zu dieser Zeit konnte wissenschaftlich bewiesen werden, dass Mäuse eine ansonsten letale Ganzkörperbestrahlung überlebten, wenn ihre Milz gegenüber der Bestrahlung abgeschirmt wurde (Jacobson, Simmons et al. 1951).

Die Begründung für ihr Überleben lag darin, dass neben dem Knochenmark –Hauptblutbildungsort beim Menschen- bei der Maus auch die Milz zeitlebens an der Blutbildung beteiligt ist. Bleibt diese von den Folgen der Bestrahlung verschont, so kann sich das blutbildende System wieder regenerieren.

Im Jahre 1956 gelang zum ersten Mal im Mausmodell die erfolgreiche Knochenmarktransplantation mit der anschließenden Wiedererlangung einer funktions-tüchtigen Hämatopoiese (Barnes, Corp et al. 1956, Ford, Hamerton et al. 1956). Bereits im darauffolgenden Jahr wurden durch E.D. Thomas, der als Pionier der Knochenmarktransplantation in die Medizinhistorie einging und dafür 1990 auch den Nobel-Preis für Medizin und Physiologie erhielt, die ersten Knochenmarkübertragungen beim Menschen beschrieben (Thomas, Lochte et al. 1957).

So sind, 58 Jahre nach der erstmals in der Literatur beschriebenen und durchgeführten HSZT, weltweit steigende Transplantationsfallzahlen in kurativer Intention zu verzeichnen, vor allem für maligne, aber auch für nicht-maligne hämatologische Erkrankungen wie beispielsweise der Aplastischen Anämie oder Hämoglobinopathien (Gratwohl, Baldomero et al. 2013).

Bei einer Knochenmarktransplantation handelt es sich per definitionem um die Übertragung von HSC aus dem Knochenmark eines gesunden Spenders auf den Empfänger mit dem Ziel, die dort krankhaft veränderte Blutbildung zu ersetzen (Urbano-Ispizua et al., 2002). Voraussetzung hierfür ist die Transfusion einer ausreichenden Anzahl von HSC. Aktuelle Richtlinien zur Herstellung und Anwendung hämatopoietischer Stammzellzubereitungen empfehlen diesbezüglich die Entnahme von 10-15 ml, maximal 20 ml Knochenmarkblut/kg des Spenderkörpergewichtes bei Erwachsenen, wobei eine Aspirationsmenge von 1.500 ml in ihrer Gesamtheit nicht überschritten werden sollte. Bei Kindern beträgt das maximale Entnahmevolumen 25% ihres Körperblutvolumens (Deutsches Ärzteblatt 2014). Für die Reinfusion der Knochenmarkstammzellen beim Empfänger gilt eine Transplantatdosis von $2-3 \times 10^8$ nukleären Zellen/kg seines Körpergewichtes oder andernfalls mindestens $1-2 \times 10^6$ CD34-positive Zellen/kg Körpergewicht als Standard. Diese Empfehlungen sind nicht immer einzuhalten. Im Falle einer notwendigen Erythrozytendepletion bei einer ABO-Major-Inkompatibilität kann nach einer derartigen Manipulation des Stammzellpräparates die geforderte Transplantatdosis für die kernhaltigen Zellen nicht mehr erreicht werden. Hierfür dient die Wiederfindungsrate der CD34-positiven Zellen, die sogenannte „Recovery“ als Surrogatmarker für die Ersatzmindestdosis im Stammzellprodukt. Diese sollte einen Wert von $1,5 \times 10^6$ CD34-positiven Zellen/kg Körpergewicht des Empfängers nicht unterschreiten. Vorangegangene Studien belegen zudem eine verkürzte Regenerationszeit der Hämatopoiese bei Einhaltung der empfohlenen Transplantatdosen (Kiss et al., 1997).

Bei der Transplantation von HSC unterscheidet man zwischen der autologen HSZT, bei der Spender und Empfänger die gleiche Person sind und der allogenen HSZT, bei der Spender

und Empfänger unterschiedliche Individuen, aber derselben Spezies sind. Bei Letzterer kann die Transplantation syngen, das heißt zwischen eineiigen Zwillingen mit einer absoluten HLA-Kompatibilität, oder von einem passenden Geschwisterspender oder von einem Fremdspender mit einer möglichst hohen HLA-Kompatibilität erfolgen.

1.4.1 Allgemeine Voraussetzungen effizienter Transplantationen

Die wichtigste Voraussetzung für eine erfolgreiche allogene Knochenmarktransplantation mit vermindertem Abstoßungsrisiko ist zunächst die Verfügbarkeit eines geeigneten -entweder verwandten oder aber nichtverwandten- Spenders. Um die notwendige Kompatibilität zwischen Empfänger und einem möglichen Spender zu bestimmen, bedient man sich der Analyse spezifischer Gewebeantigene. Diese wurden beim Menschen erstmals in der Zellmembran der Leukozyten nachgewiesen und werden als humanes Leukozytenantigen (HLA)- System bezeichnet. Die genetische Codierung befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 und trägt entscheidend zur immunologischen Identität des Menschen bei. Für das adaptive Immunsystem, hierzu zählen B- und T-Lymphozyten sowie die von ihnen produzierten Effektormoleküle, spielen zwei HLA-Klassen eine entscheidende Rolle: HLA-Klasse-I Antigene (HLA-A, -B, -C), die praktisch auf allen kernhaltigen Zellen sowie Thrombozyten zu finden sind und HLA-Klasse-II Antigene (HLA-DR, -DQ, -DP), deren Expression auf eine kleine Gruppe von Zelltypen begrenzt ist, wie den B-Zellen, Monozyten, Endothelzellen und antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie den dendritischen Zellen.

Die zentrale immunbiologische Funktion der HLA-Moleküle ist die Antigenpräsentation und demnach, in der Ausprägung des komplexen und anpassungsfähigen Immunsystems, die Unterscheidung in körpereigen und körperfremd (Klein and Sato, 2000). Die Vielfalt des HLA-Systems, vor allem aufgrund eines ausgeprägten genetischen Polymorphismus, d.h. durch das Vorhandensein vieler verschiedener HLA-Allele pro Genlocus und die damit verbundene Frage von Übereinstimmung oder Nicht-Übereinstimmung zwischen zwei Individuen in diesen Merkmalen, stellt die Basis für die Spenderauswahl im Bereich der Transplantationsmedizin dar. Eine Nicht-Übereinstimmung in einem bestimmten HLA-Merkmal, einem sogenannten Mismatch zwischen Spender und Empfänger in der vorangegangenen Typisierung, kann eine Transplantatabstoßung, erhöhte Infektanfälligkeit oder ein erhöhtes Risiko für eine Graft-versus-Host- Disease (GvHD) zur Folge haben (Hoodin and Weber, 2003, Arguello et al., 1998). Um die HLA-Kompatibilität zwischen Empfänger und

möglichem Spender zu ermitteln, werden im genetischen Typisierungsprozess die Allele von HLA-A, -B, -C und DRB1 sowie DQB1 bestimmt und verglichen (El Kassar et al., 2001, Mickelson et al., 2002). Die immungenetische Spenderauswahl hat somit das Ziel einer möglichst kompletten Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger, in insgesamt zehn Allelen (HLA- Haplotyp von Mutter und Vater) an den fünf genannten Genorten HLA- A, -B, -C, -DQB1 und -DRB (Schreuder et al., 2005). Am besten eignen sich folglich HLA-kompatible Geschwister, bei denen genetisch bedingt ein hoher Grad an HLA-Kompatibilität besteht. Ein solch passender Spender wird bei immer weiter sinkenden Geschwisterzahlen in den Familien jedoch nur in etwa 20 bis 30% der Transplantationsfälle gefunden. Aus diesem Grund wird über Knochenmarkspenderregister nach einem geeigneten alternativen Spender gesucht. Für eine komplikationslose HSZT kommen vor allem HLA-kompatible Fremdspender mit einer Übereinstimmung in zehn von zehn HLA-Merkmalen infrage (Marks et al., 2006). Wird unter diesen Kriterien kein passender Spender gefunden und der Krankheitsverlauf erfordert eine zeitnahe Transplantation, so kommen auch teilkompatible Spender mit einer Übereinstimmung in mindestens acht bis neun HLA-Merkmalen oder haploidente Familienspender mit 50% genetischer HLA-Übereinstimmung infrage. Durch den anhaltenden technischen Fortschritt und die Optimierungen in der Transplantataufarbeitung mit CD34-positiver Stammzellisolierung ist es heutzutage möglich, CD34-positive hochangereicherte Stammzellprodukte zu transplantieren und über die zeitgleiche indirekte T-Zell- Depletion gewisse HLA-Barrieren zu überwinden (Handgretinger and Lang, 2008). Eine weitere wichtige Voraussetzung vor allogener Knochenmarktransplantation ist die vorangegangene myeloablative Konditionierungsbehandlung des Empfängers, bestehend aus Chemotherapie und/oder Ganzkörperbestrahlung (TBI= total bodyirradiation) mit der Verfolgung zweier Hauptziele. Dies sind zum einen die Eradikation der malignen Zellen und zum anderen die erwünschte Immunsuppression des Empfängers, um das Risiko einer Transplantatabstoßung zu verhindern und eine Immuntoleranz zu etablieren.

1.4.2 AB0-Konstellation zwischen Spender und Empfänger

Neben der HLA- Kompatibilität spielt auch das AB0-Blutgruppensystem des Spenders und Empfängers eine wichtige Rolle bei der HSZT. Die optimale AB0-Konstellation zwischen

Spender und Empfänger zur Vermeidung unerwünschter Nebenwirkungen bildet zweifelsohne die blutgruppenidentente Knochenmarktransplantation.

Eine Blutgruppenunverträglichkeit hingegen stellt nach heutigen wissenschaftlichen Erkenntnissen, im Gegensatz zur Transplantation solider Organe, keine absolute Kontraindikation einer allogenen Stammzellspende dar (Petz, 1987). Dennoch sind, vor allem aus der Gefahr einer resultierenden schwerwiegenden Hämolyse heraus, die vorrangig bei AB0-Minor-Inkompatibilitäten zu verzeichnen ist, besondere Vorkehrungen und Vorsichtsmaßnahmen erforderlich.

In etwa 40% der Spender-Empfängerkonstellationen besteht eine Blutgruppeninkompatibilität in Form einer Major-Inkompatibilität, bei der der Empfänger Isoagglutinine gegen die Spendererythrozyten bildet (z.B. Spender A, Empfänger 0), einer Minor-Inkompatibilität bei der der Spender Isoagglutinine gegen die Erythrozyten des Empfängers aufweist (z.B. Spender 0, Empfänger A) oder einer kombinierten AB0-Major- und Minor-Inkompatibilität (z.B. Spender A, Empfänger B) (Petz, 1998, Stussi et al., 2009) (Gratwohl et al., 2002).

Bei Knochenmark als Stammzellquelle können die entnommenen Stammzellen problemlos ohne weitere Aufarbeitung infundiert werden, wenn Spender und Empfänger blutgruppenident sind. Andernfalls wird das Produkt erythrozyten- und/oder plasmadepletiert. Am Ende der Transplantation, nach erfolgtem Engraftment der Stammzellen des Spenders ins zuvor abladierte Knochenmark des Empfängers, nimmt dieser schließlich die Blutgruppe des Spenders an.

Die Antikörper gegen Empfängererythrozyten bei einer AB0-Minor-inkompatiblen HSZT können passiv im Rahmen der Transplantation übertragen oder nachträglich als Reaktion auf die Empfängerantigene durch das transplantierte Spenderimmunsystem gebildet werden (Gajewski et al., 1992). In diesem Fall wird die vorherige Reduktion des Plasmas notwendig.

Bei einer Major-Inkompatibilität erfolgt vor der geplanten Transfusion der Stammzellen eine Erythrozytendepletion. Hier steht nicht nur die akute Hämolyse bei der Transplantation, sondern vielmehr das Risiko einer verzögerten Regeneration der Spendererythropoiese im Vordergrund (Worel et al., 2003). Generell gilt es, mit den Verfahren der Erythrozyten- oder Plasmazelldepletion das Risiko einer Immunhämolyse oder das Auftreten einer verzögerten Hämatopoiese nach erfolgreicher Transplantation weitestgehend zu minimieren. (Bolan et al., 2001a).

Die im Falle einer AB0-Inkompatibilität notwendige Transplantataufarbeitung in Form einer Erythrozytendepletion wird mithilfe des COBE Spectra-Zellseparators vorgenommen. Hierbei handelt es sich um einen auf dem Zentrifugenprinzip basierenden, automatischen

Blutzellseparator. Die Erythrozyten besitzen die höchste Dichte aller Blutzellen und lagern sich somit am Zentrifugenrand ab. Das zellarme Blutplasma verbleibt in der Mitte der Zentrifuge. Zwischen dem Erythrozytensediment und dem Blutplasma bildet sich ein sogenannter Buffy-Coat, der aufgrund ihrer ähnlichen Dichte aus Leuko- und Thrombozyten besteht. In einer Schicht des Buffy-Coat sind die für die Knochenmarktransplantation benötigten Stammzellen enthalten. Die Erythrozytendepletion hat zum Ziel, einen Erythrozytengehalt <20 ml im Transplantat (bzw. von $< 0,25-0,5$ ml Erythrozyten/kg Körpergewicht des Empfängers) und parallel eine höchstmögliche Ausbeute (Recovery) an nukleären und CD34-positiven Zellen aus dem Buffy-Coat zu erreichen. Letzteres ist von Bedeutung, da das spätere Engraftment sowie die hämato- und immunologische Rekonstitution nach Transplantation erwiesenermaßen mit der Menge der transfundierten Stammzellen korrelieren (Korbling et al., 1995, Bensinger et al., 1994).

Die Tabelle 1 stellt eine Übersicht möglicher Komplikationen einer AB0-Blutgruppen-non-identen Transplantation dar (modifiziert nach Seebach et al., 2005).

AB0-Mismatch	Spender	Empfänger	Komplikationen
Minor	0	A, B oder AB	Hämolyse
	A, B	AB	Erhöhtes Risiko für GvHD
Major	A, B oder AB	0	Pure-Red-Cell-Aplasia
	AB	A, B	Langsameres Engraftment und erhöhtes Risiko für GvH
Bidirektional	A	B	Hämolyse und Pure-Red-Cell-Aplasia
	B	A	Reduziertes OS, langsames Engraftment und erhöhtes Risiko für GvHD

Tabelle 1: Mögliche Komplikationen einer AB0-Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger nach Seebach et al., 2005. Abkürzungen: GvHD=Graft-versus-Host-Disease, OS=Overall Survival (Gesamtüberleben)

1.4.3 Graft-Manipulation

Die Graft-Manipulation beschreibt die chemische oder immunologische Transplantat-aufarbeitung mit dem Ziel, die spätere Transplantatzusammensetzung so zu verändern, dass das Risiko einer Transfusionskomplikaion oder einer Graft-versus-Host-Disease (GvHD) weitestgehend minimiert und der Zeitpunkt des anschließenden Engraftments verkürzt wird.

Durch Positiv- oder Negativselektion, d.h. durch Anreicherung oder Depletion definierter Zellgruppen, ist es möglich, HSC in hoher Reinheit von gesunden Spendern zu gewinnen. So gelingt durch Immunselektion mittels monoklonaler Antikörper gegen den Oberflächenmarker CD34 eine Positivanreicherung der HSC. Die mit der CD34-positiven Zellselektion einhergehende indirekte T-Zell-Depletion vermindert das Risiko der GvHD bei bestehender HLA-Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger (Aversa et al., 1998).

Der Nachteil einer im Falle der HLA-Inkompatibilität planmäßig durchgeführten T-Zell-Depletion, als Beispiel für die Negativselektion, ist jedoch die verzögerte Immunregeneration des T-Zellsystems. Beim Empfänger kann dies mit einem entsprechend erhöhtem Infektionsrisiko mit schwerem Verlauf einhergehen (Ho and Soiffer, 2001). Weiterhin produzieren T-Zellen spezielle Wachstumsfaktoren, die für das Anwachsen hämatopoietischer Zellen im Knochenmark und somit für das Transplantatengraftment unerlässlich sind.

Im Falle der oben beschriebenen AB0-Unverträglichkeit zwischen Spender und Empfänger wird bei einer Major-Inkompatibilität die Erythrozytendepletion und bei einer Minor-Inkompatibilität die Plasmadepletion erforderlich. Hierzu erfolgt alternativ eine Erythrozytensedimentation, Buffy-Coat-Präparation oder Zytozentrifugation (Soydan et al., 2007).

Grundsätzlich zu beachten ist im Aufarbeitungsprozess, dass jegliche Manipulation am Stammzellprodukt die in ihm enthaltenen Stammzellen schädigen und somit vermindern kann.

1.4.4 Immunregeneration und Engraftment

Unter der Knochenmarkrekonstitution mit Immunregeneration versteht man die Einnistung der Spenderstammzellen in das zuvor mittels Konditionierungstherapie abladierte Knochenmark des Empfängers, mit anschließender Normalisierung der Knochenmark-zellularität, Wiederaufnahme der Blutbildung und Immunkompetenz. Maßgebend für eine

zeitnahe und normgerechte Knochenmarkrekonstitution sind Faktoren wie die Beschaffenheit des Transplantates (manipuliert/unmanipuliert), die HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger, das Alter des Patienten oder das Auftreten einer GvHD sowie die verabreichte medikamentöse Immunprophylaxe (Storek, 2008).

Als Engraftment wird nach erfolgter Knochenmarktransplantation der Zeitpunkt bezeichnet, an dem das Transplantat in der Lage ist, eine suffiziente Anzahl an Blutzellen zu bilden und diese auch peripher ohne die Notwendigkeit einer Zellsubstitution aufrecht zu erhalten. Für die Wiederaufnahme der Hämatopoiese und eine zeitnahe Immunrekonstitution ist ein schnelles Transplantatanwachsen folglich unerlässlich.

Das Engraftment wird anhand von Laborparametern quantifiziert. Für die neutrophilen Granulozyten gelten $>0,5$ Zellen/nl, für die Leukozyten >1 Zelle/nl und für Thrombozyten >20 Zellen/nl konstant an drei aufeinanderfolgenden Tagen im peripheren Blut des Empfängers als erfolgreiches Engraftment. Dies ist bei Verwendung von Stammzellen aus dem Knochenmark in der Regel zwischen dem 14. und 28. Tag post transplantationem erreicht. Sind am Tag 28-42 nach Transplantation die oben genannten absoluten Zellzahlen nicht erreicht, so spricht man definitionsgemäß vom primären Transplantatversagen (Graft Failure) (Davies et al., 1994, Donohue et al., 1993). Von einem sekundären Graft Failure spricht man indes, wenn nach einem bereits erfolgten Engraftment die Zellzahlen im Empfänger wieder abfallen. Insgesamt ist das Transplantatversagen jedoch eine sehr selten auftretende Komplikation mit $<5\%$ der Fälle (Anasetti et al., 1989).

1.4.5 Komplikationen nach allogener Knochenmarktransplantation

Nach erfolgter Transplantation sind die transplantierten Stammzellen in der Lage, gezielt in das Knochenmark des Empfängers einzuwandern (Homing), dort anzuwachsen (Engraftment) und ein funktionsfähiges Immunsystem zu etablieren (Rekonstitution). Bis zum Zeitpunkt des Engraftments besteht im Empfängerorganismus eine schwere Myelosuppression mit Immundefizienz. In dieser Zeit sind die Patienten besonders anfällig für schwere, letale Infektionen. In der frühen aplastischen Phase, etwa 12-14 Tage nach der Knochenmarktransplantation, überwiegen Infektionen mit grampositiven und -negativen Bakterien sowie Pilzen. Nach dem Anwachsen des Transplantates sind vor allem Cytomegalieviren (CMV) und Aspergillen gefürchtete Erreger einer interstitiellen Pneumonie (Sulahian et al., 2001). In der Regel sind die Patienten nach einer

Knochenmarktransplantation mit einem komplikationslosen Verlauf und regelrechter Immunrekonstitution ab dem 2. Posttransplantationsjahr nicht mehr durch opportunistische Infektionen gefährdet.

Die häufigste Komplikation nach allogener Knochenmarktransplantation stellt die GvHD dar (Ferrara and Deeg, 1991). Sie ist mit einem sehr hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko vergesellschaftet (Ferrara and Reddy, 2006). Die GvHD ist das Resultat einer immunologischen Reaktion vitaler T-Lymphozyten des Spenders im Transplantat auf antigenpräsentierende Zellen im gesunden Empfängergewebe (Pidala and Anasetti, 2010). Es handelt sich um eine unerwünschte Interaktion zwischen den Immunsystemzellen von Spender und Empfänger des Transplantates. Die GvHD kann dabei trotz initialer immunsuppressiver Prophylaxe und trotz umfänglicher HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger auftreten (Goker et al., 2001).

Im zeitlichen Verlauf unterscheidet man die akute GvHD, die innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation bei 30-70% der Patienten auftritt (Jakobson and Vogelsang, 2007), von der chronischen Form, die zu jedem späteren Zeitpunkt bei 20-80% der Patienten auftreten kann (Sun et al., 2007). Aber nicht nur die zeitliche Komponente unterscheidet die akute von der chronischen GvHD, sondern auch die Art der entsprechenden Organbeteiligung. Die klassischen Zielorgane der akuten Form sind v.a. Organe mit epithelialen Oberflächen wie die Haut mit resultierender Erythrodermie und makulopapulösem Exanthem, der Gastrointestinaltrakt typischerweise mit Diarrhoen in Form einer Enteritis und die Leber mit ikterischem Verlauf und einem möglichen Leberversagen. Die chronische GvHD manifestiert sich zusätzlich zu den Symptomen, die für die akute Form genannt werden, mit solchen, die vor allem an Kollagenosen aus dem Kreis der Autoimmunerkrankungen erinnern. Dies sind im Speziellen sklerodermiforme und lichenoidale Hautveränderungen sowie die Bronchiolitis obliterans und die Xerodermie (Vogelsang et al., 2003). Sowohl die Inzidenz als auch der Schweregrad der Ausprägung der GvHD hängen u.a. von der HLA-Konstellation zwischen Spender und Empfänger, der Menge transplantierte Stammzellen sowie der Anzahl der transplantierten T-Zellen im Transplantat ab (Vargas-Diez et al., 2003). Je größer das HLA-Mismatch, desto höher die GvHD-Rate und das Risiko eines schwereren Verlaufes.

1.5 Fragestellung der Arbeit

Die allogene Transplantation hämatopoietischer Stamm- und Progenitorzellen aus dem peripheren Blut oder dem Knochenmark ist eine mögliche Therapieform in kurativer Intention bei einer Vielzahl lebensbedrohlicher, maligner und nicht-maligner Erkrankungen, sowohl im Kindes- als auch im Erwachsenenalter. Hierbei ist über die Jahre hinweg deutschland- und weltweit, ein stetiger Zuwachs an Transplantationsfallzahlen zu verzeichnen. Allen voran ermöglichen die fortwährenden wissenschaftlichen Neuerkenntnisse und Therapieoptimierungen im Bereich der HSZT ihre tendenzielle Indikationsausweitung. In der Regel wird die allogene HSZT bevorzugt zwischen einem kompatiblen HLA- und möglichst blutgruppenidenten Spender und Empfänger vollzogen. Dies ist in einigen Fällen aus verschiedenen Gründen nicht immer realisierbar. In der Hälfte der allogenen Knochenmarktransplantationen liegt ein ABO-Mismatch vor, mit dem gefürchteten Risiko einer sofortigen Hämolyse durch inkompatible Erythrozyten im Transplantat oder aber einer verzögert auftretenden Hämolyse durch transplantierte Spender-B-Lymphozyten, die im Verlauf Antikörper gegen die Empfängererythrozyten bilden können. Im Falle einer HLA-Inkompatibilität ist die gefürchtetste Komplikation die GvHD. Insbesondere die Nebenwirkungen der akuten oder protrahierten Hämolyse nach der Transfusion des Transplantates eines ABO- oder HLA-inkompatiblen Spender-Empfängerstatus können durch spezielle Aufarbeitungsmechanismen des Transplantates, wie der Erythrozyten- bzw. Plasmadepletion, verhindert werden.

Anhand zusammengetragener transplantationsspezifischer Parameter allogener Knochenmarktransplantationen wird in dieser retrospektiven statistischen Analyse untersucht, in welchem Ausmaß die Aufarbeitung des Transplantates unter o.g. Indikation, selbiges in Volumen und Zellzahl verändert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob nach einer Erythrozyten- und/oder Plasmadepletion bei einer ABO-Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger die in der zentralen Stellungnahme (http://www.dgti.de/docs/doclink/10251/Gemeinsame_Stellungnahme_Endversion_080509_samt_Anhang.pdf; http://www.dgti.de/docs/doclink/10251/GSN_Revidierte%20Ergaenzung_010311_mit%20Korrekturmodus_Druckversion_140311.pdf) für eine erfolgreiche Transplantation festgelegte Mindestdosis kernhaltiger Zellen noch erreicht wird. Ferner sollte geklärt werden, ob alternativ eine andere Messgröße, wie etwa die CD34-positiven Zellen/kg Körpergewicht des Empfängers einen sinnvollereren Parameter für die erfolgreiche Knochenmarktransplantation darstellt.

2 Patienten, Materialien und Methoden

2.1 Patientenkollektiv:

Die retrospektive Analyse dieser Arbeit umfasst für den Erhebungszeitraum vom 01.01.2000 bis 04.12.2013 Daten eines Kollektives von insgesamt 72 Patienten (31 Frauen und 41 Männer), die aufgrund einer hämatoonkologischen Erkrankung eine allogene Knochenmarktransplantation in der II. Medizinischen Klinik des UKSH erhielten, hier speziell seit dem 01.07.2004 in der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie im Dr. Mildred-Scheel Haus des Universitätsklinikums Schleswig Holstein, Campus Kiel.

2.2 Datenerfassung

Auf der Grundlage archivierter Transplantationsprotokolle sowie den dazugehörigen digitalisierten Patientenakten allogener Knochenmarktransplantationen der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie des Mildred-Scheel-Hauses in Kiel bzw. der II. Medizinischen Klinik erfolgte für den Zeitraum von 13 Jahren (01/2000 bis 12/2013) eine rückblickende Datenerfassung und tabellarische Zusammenstellung.

Dabei wurden die folgenden Parameter erhoben: Alter der Patienten am Tag der Transplantation, die HLA- Übereinstimmung und Blutgruppenzugehörigkeit von Knochenmarkspender und -empfänger, Knochenmarkvolumina nach Spendenentnahme und vor Transfusion beim Empfänger sowie selbiges nach Knochenmarkprozessierung bei Inkompatibilität der Blutgruppen, weiterhin der Wirkstoffgehalt der CD34-positiven, CD45-positiven und nukleären Zellen, ebenso der Erythrozytengehalt in den unverarbeiteten und prozessierten Knochenmarkspenden sowie Daten zum Engraftment nach der Transplantation.

Die Datenerfassung und -zusammenstellung in Tabellenform erfolgte mithilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel (Version 14.0) für das Windows-Betriebssystem.

2.3 Statistische Methodik

Die statistische Datenauswertung und die Erstellung der Graphiken wurde mittels der Statistiksoftware GraphPadPrism für Windows (Version 5.0) vorgenommen.

Die deskriptive Statistik zur Datenvisualisierung wurde mithilfe von Box-Whisker Plots nach J. W. Tukey mit Angabe des Medians, des 1. und 3. Quartils, des oberen und unteren Whiskers im Interquartilabstand sowie der Darstellung vorhandener Ausreißergrößen erstellt. Boxplots werden angewandt, um die Verteilung numerischer Daten graphisch darzustellen. Die geometrische Form eines Rechteckes stellt hierbei die eigentliche Box dar, in der sich insgesamt 50% der Daten befinden. Sie wird vom unteren und oberen Quartil begrenzt. Oberhalb des unteren Quartils befinden sich 75% und oberhalb des oberen Quartils noch 25% der Daten. Der Interquartilsabstand (Interquartilerange = IQR) ist anhand der Länge der Box abzulesen und stellt ein Maß für die Streuung der Messwerte dar. Ober- und unterhalb der Box befinden sich des Weiteren die sogenannten Whisker (Antennen), die alle Daten darstellen, die sich noch innerhalb des 1,5-fachen IQR befinden. Alle Werte, die außerhalb des 1,5-fachen IQR zu liegen kommen, werden als Ausreißer bezeichnet. Ein Vorteil der Bestimmung des Medianwertes, z.B. für die mittlere Altersangabe einer Stichprobe gegenüber dem arithmetischen Mittel, ist hierbei dessen Beständigkeit gegenüber möglichen Ausreißergrößen.

Die statistische Datenanalyse erfolgte bei Annahme eines nicht normalverteilten Datensatzes mittels nicht-parametrischer Testverfahren. Hier kommt für den Vergleich von Merkmalen unverbundener Stichproben der Mann-Whitney-U-Test und für gepaarte Stichproben, beispielsweise für den Vergleich von Merkmalen zwischen Knochenmarkspenden vor und nach Verarbeitung, der Wilcoxon Rangsummen-Test zum Einsatz.

Für die Berechnung der Depletionseffizienz (DepEff) in Prozent wurden folgende Rechengrößen berücksichtigt:

Erythrozytenvolumen eines Produktes [ml] = (Produktvolumen [ml] × Hämatokrit [%])/100

Erythrozytenvolumen/kg Körpergewicht des Empfängers vor Erythrozytendepletion (EVol1/kg)

Erythrozytenvolumen/kg Körpergewicht des Empfängers nach Erythrozytendepletion (EVol2/kg)

Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$DepEff = 100\% - ((EVol2/kg)(EVol1/kg)) * 100$

3 Ergebnisse

Von den insgesamt 72, in dieser Arbeit berücksichtigten und ausgewerteten, allogenen Knochenmarktransplantationen, wurden 34 Spenden erythrozytendepletiert und 38 unmanipuliert transfundiert. Somit ergaben sich für die retrospektive statistische Analyse dieser Studie zwei zu vergleichende Subgruppen, die Gruppe, die mit unmanipulierten Transplantaten behandelt wurde und die Gruppe, die mit aufgearbeiteten Produkten transplantiert wurde.

3.1 Alters- und Geschlechterverteilung

In die vorliegende retrospektive Studie wurden insgesamt 72 Patienten eingeschlossen (weiblich n=31, männlich n=41). Hierbei waren unter den 34 Empfängern erythrozytendepletierter Knochenmarkspenden 16 weiblichen und 18 männlichen Geschlechtes. In der Gruppe der Patienten, die unverarbeitete Knochenmarkprodukte (n=38) erhielten, befanden sich 17 Frauen und 21 Männer.

Das mediane Alter aller Patienten (n=72) lag bei 16 Jahren mit einem Minimum von 1 Jahr und einem Maximum von 68 Jahren. In der Gruppe der Empfänger, die mit erythrozytendepletierten Produkten transplantiert worden waren (n=34), lag das mediane Alter bei 14,5 Jahren mit einem Minimum von 2 Jahren und einem Maximum von 68 Jahren. In der Gruppe der Empfänger, die mit unverarbeitetem Knochenmark transplantiert wurden (n=38), lag das mediane Alter bei 17 Jahren mit einem Minimum von 1 Jahr und einem Maximum von 62 Jahren.

Bezüglich der Altersverteilung in den beiden Gruppen der Empfänger verarbeiteter und unverarbeiteter Knochenmarkprodukte, war kein signifikanter Altersunterschied zu verzeichnen (siehe Anhang Abbildung 1).

3.2 AB0-Konstellationen zwischen Spender und Empfänger

Von den 72 in die Analyse einbezogenen allogenen Knochenmarktransplantationen erfolgten 38 zwischen blutgruppenidenten Spendern und Empfängern ohne weitere Transplantataufarbeitung vor der Stammzelltransfusion. Die restlichen Transplantationen (n=34) zeigten hingegen eine AB0-Inkompatibilität. Dabei lag in 12 Spender-Empfänger-Konstellationen eine AB0-Major-Inkompatibilität, in 18 Spender-Empfänger-Konstellationen eine AB0-

Minor-Inkompatibilität und in vier Spender-Empfänger-Konstellationen eine kombinierte Major- und Minor-AB0-Inkompatibilität vor.

3.3 Volumen der Knochenmarkspenden vor der Verarbeitung

Das Ausgangsvolumen des entnommenen Knochenmarks war für 71 von 72 Spenden dokumentiert und betrug im Median 1.200 ml mit einem Minimum von 330 ml und einem Maximum von 2.080 ml.

Auch in den beiden Gruppen der erythrozytendepletierten (n=33) und unverarbeiteten Spenden (n=38) lag der Median des Ausgangsvolumens bei jeweils 1.200 ml. Bei den erythrozytendepletierten Spenden ergaben sich ein Minimum von 669 ml und ein Maximum von 1.892 ml im Ausgangsvolumen vor Verarbeitung sowie ein Minimum von 330 ml und ein Maximum von 2.080 ml im Produktvolumen der unverarbeiteten Spenden.

Zusammenfassend ließ sich für das Ausgangsvolumen der für die Weiterverarbeitung vorgesehenen Spenden und jener ohne weitere notwendige Manipulation, kein signifikanter Volumenunterschied feststellen (siehe Anhang Abbildung 2).

3.4 Knochenmarkvolumina vor und nach der Verarbeitung

Das mediane Volumen der Knochenmarkstransplantate nach Entnahme und vor einer eventuellen Verarbeitung zeigte zwischen der Gruppe der Produkte, die nicht verarbeitet wurden (n=38, 1.200 ml, Minimum: 330 ml, Maximum: 2.080 ml) und der Gruppe der Transplantate, die einer Verarbeitung unterzogen wurde (n=33, 1.200 ml, Minimum: 669, Maximum: 1.892 ml), keinen signifikanten Unterschied. Das mediane Volumen der verarbeiteten Transplantate nach Verarbeitung (n=34, 159 ml, Minimum: 105 ml, Maximum: 238 ml) war signifikant (p=0,0001) geringer verglichen mit dem Volumen dieser Produkte vor Verarbeitung (siehe Anhang Abbildung 3).

3.5 Wirkstoffgehalt der CD34-positiven Zellen vor und nach Knochenmarkverarbeitung

Bei den 38 unverarbeiteten Knochenmarkspenden lagen in 27 Fällen valide Angaben zum Gehalt der CD34-positiven Zellen/kg Körpergewicht (KG) vor. Dabei lag der Wirkstoffgehalt der CD34-positiven Zellen im Median bei $2,97 \times 10^6$ CD34-positiven Zellen/kg KG, mit einem Minimum von $0,45 \times 10^6$ und einem Maximum von $10,4 \times 10^6$ CD34-positiven Zellen/kg KG.

Von den ursprünglich 34 verarbeiteten Spenden war für 32 Spenden der Wirkstoffgehalt der CD34-positiven Zellen für das entnommene Knochenmark dokumentiert. Der mediane Gehalt betrug $2,76 \times 10^6$ CD34-positive Zellen/kg KG vor der Verarbeitung, mit einem Minimum von $1,07 \times 10^6$ und einem Maximum von $19,31 \times 10^6$ CD34-positiven Zellen/kg KG. Für die Berechnung des Gehaltes CD34-positiver Zellen nach der Verarbeitung standen für alle 34 Transplantate vollständige Daten zur Verfügung. Der Median betrug hierbei $3,25 \times 10^6$ CD34-positive Zellen/kg KG, mit einem Minimum von $0,9 \times 10^6$ und einem Maximum von $18,7 \times 10^6$ CD34-positiven Zellen/kg KG.

Der Vergleich des Wirkstoffgehaltes CD34-positiver Zellen zwischen unverarbeiteten Produkten und verarbeiteten Produkten vor und nach der Verarbeitung, ergab keinen signifikanten Unterschied (siehe Anhang Abbildung 4).

3.6 Gehalt der nukleären Zellen im Produkt vor und nach Knochenmarkverarbeitung

Für 36 von insgesamt 38 unverarbeiteten Knochenmarkspenden betrug der Median der nukleären Zellen (NC) $3,15 \times 10^8$ Zellen/kg KG, mit einem Minimum von $0,9 \times 10^8$ Zellen/kg KG und einem Maximum von $12,2 \times 10^8$ Zellen/kg KG im Transplantat. Bei 33 von 34 verarbeiteten Spenden lagen Daten zum Gehalt der NC vor der Verarbeitung vor. Der Median betrug $3,6 \times 10^8$ Zellen/kg KG bei einem Minimum von $1,2 \times 10^8$ Zellen/kg KG und einem Maximum von $16,9 \times 10^8$ NC-Zellen/kg KG. Insgesamt waren die medianen Werte zwischen beiden Gruppen vergleichbar und statistisch nicht unterschiedlich.

Nach der Knochenmarkverarbeitung resultierte für die 34 Spenden eine mediane Anzahl der NC von $1,5 \times 10^8$ Zellen/kg KG, mit einem Minimum von $0,4 \times 10^8$ Zellen/kg KG und einem Maximum von $5,6 \times 10^8$ Zellen/kg KG im Transplantat.

Der Vergleich der Daten zeigte, dass der Median der NC nach Erythrozytendepletion gegenüber dem vor Verarbeitung signifikant ($p=0,0001$) geringer war. (siehe Anhang Abbildung 5).

3.7 Recovery der verschiedenen transplantationsspezifischen Zellpopulationen

Die Recovery beschreibt die Wiederfindungsrate der transplantationsspezifischen Zielzellen, z.B. nach immunmagnetischer Selektion oder nach anderen Manipulationen.

Für die CD34-positiven Zellen ergab sich nach der Transplantataufarbeitung der weiterverarbeiteten Spenden ($n=32$) eine Recovery von 111,7% CD34-positiver Zellen im Median mit einem Minimum von 64,2% und einem Maximum von 217,6%.

Im Bereich der NC betrug für die verarbeiteten Transplantate (verfügbare Daten für $n=33$) die mediane Recovery 41,0%, bei einem Minimum von 16,5% und einem Maximum von 85,1%.

Für die CD45-positiven Zellen ergab sich für 32 verarbeitete Transplantate eine mediane Recovery von 46,8%, mit einem Minimum von 16,8% und einem Maximum von 102,7%.

In der Summe kam es somit zu einem statistisch signifikanten ($p=0,0001$) Verlust von NC- und von CD45-positiven Zellen im Rahmen der Transplantatverarbeitung. Anders verhielt es sich hingegen für die CD34-positiven Zellen, diese zeigen nach der Verarbeitung im Median sogar einen signifikanten ($p=0,0001$) Anstieg (siehe im Anhang Abbildung 6).

3.8 Daten zum Hämatokrit in den Knochenmarkprodukten

Als Hämatokrit definiert man den prozentualen Anteil des Erythrozytenvolumens am Gesamtvolumen des Blutes. Den Hauptanteil des Hämatokrits bilden mit insgesamt 96% die Erythrozyten. In der folgenden Gegenüberstellung geht es um den Vergleich der Hämatokrit-Werte zwischen den unverarbeiteten und den erythrozytendepletierten Spenden.

Für die Gruppe der unverarbeiteten Spenden ($n=38$) waren valide Daten für 16 Produkte hinsichtlich Angaben zum Hämatokrit verfügbar. Im Median betrug der Hämatokrit in dieser Gruppe 27,9% bei einem Minimum von 20,8% und einem Maximum von 45,2%.

In der Gruppe der erythrozytendepletierten Knochenmarkprodukte (n=34) waren valide Daten zum Hämatokrit für 32 Spenden vor der Verarbeitung verfügbar. Der mediane Hämatokrit betrug vor Verarbeitung 31,4%, mit einem Minimum von 17,7% und einem Maximum von 39,1%.

Für die unmanipulierten und die erythrozytendepletierten Spenden vor Verarbeitung waren die medianen Hämatokritwerte statistisch nicht signifikant unterschiedlich.

Vergleicht man hingegen den medianen Hämatokrit der manipulierten Spenden vor Verarbeitung (31,4%) mit dem Median für die gleichen Knochenmarkprodukte nach der Verarbeitung (verfügbare Werte für n=33), so war der mediane Hämatokrit nach Verarbeitung mit 4,0%, bei einem Minimum von 2,1% und einem Maximum von 11,9%, signifikant ($p < 0,0001$) erniedrigt (siehe hierzu im Anhang [Abbildung 7](#)).

3.9 Daten zum Erythrozytenvolumen in den Knochenmarkprodukten

Das Erythrozytenvolumen in den Knochenmarkspenden beschreibt die Menge der Erythrozyten in Milliliter (ml) im Transplantat.

In der Gruppe der unverarbeiteten Knochenmarkspenden (n=38) standen für die Berechnung des medianen Erythrozytenvolumens Daten von 19 Produkten zur Verfügung. Für diese Gruppe betrug das mediane Erythrozytenvolumen 306 ml, bei einem Minimum von 126,3 ml und einem Maximum von 736,3 ml.

In der Gruppe der erythrozytendepletierten Knochenmarkprodukte (n=34) lagen in der retrospektiven Analyse für 31 Spenden entsprechende Daten zum Erythrozytenvolumen vor der Verarbeitung vor. Für diese Gruppe ergab sich ein medianes Erythrozytenvolumen von 352,3 ml, bei einem Minimum von 181,0 ml und einem Maximum von 591,2 ml.

Nach Erythrozytendepletion betrug das mediane Erythrozytenvolumen (verfügbare Daten für n=28) 7,2 ml im Transplantat mit einem Minimum von 3,3 ml und einem Maximum von 19,9 ml. Der statistische Vergleich zwischen den Medianen vor und nach Erythrozytendepletion zeigte einen signifikanten ($p < 0,0001$) Unterschied (siehe [Abbildung 8](#) im Anhang).

3.10 Erythrozytenvolumen je kg Körpergewicht und Erythrozyten-depletionseffizienz

Aus der Datenlage für unsere Studie ergab sich für die Knochenmarkprodukte mit validen Angaben zum Erythrozytenvolumen im Transplantat (n=28) nach der Erythrozytendepletion im Median ein Volumen von 0,15 ml blutgruppeninkompatibler Erythrozyten/kg KG des Empfängers, mit einem Minimum von 0,049 ml/kg KG und einem Maximum von 0,88 ml/kg KG (siehe im Anhang Abbildung 9.1). Die Erythrozytendepletionseffizienz (n=28) betrug im Median 97,95% mit einem Minimum von 94,05% und einem Maximum von 99,07% (siehe im Anhang Abbildung 9.2).

3.11 Leukozytenengraftment post transplantationem (Leukozyten >1/nl an drei aufeinanderfolgenden Tagen)

Für den Vergleich des Engraftments der Leukozyten zwischen den Gruppen der Patienten, die entweder mit unverarbeiteten oder mit erythrozytendepletierten Knochenmarkprodukten transplantiert wurden, analysierten wir insbesondere den Zeitpunkt, an dem an drei aufeinanderfolgenden Tagen mehr als ein Leukozyt pro nl im Blut des Empfängers nach Aplasie, als Zeichen des Engraftments nach Transplantation, nachweisbar war.

Für die Gruppe der 38 unverarbeiteten Spenden lagen dabei für insgesamt 32 Transplantationen valide Daten vor. Diese zeigten, dass im Median nach 18,5 Tagen ein Leukozytenengraftment beobachtet wurde, wobei das Minimum bei 5 und das Maximum bei 31 Tagen lag.

In der Vergleichsgruppe der 34 erythrozytendepletierten Knochenmarkspenden waren analysierbare Daten für 28 Transplantationen verfügbar. Diese Daten zeigten, dass in dieser Gruppe das Leukozytenengraftment im Median nach 21,5 Tagen mit einem Minimum von 12 und einem Maximum von 32 Tagen erfolgte.

Das im Median 3,5 Tage spätere Leukozytenengraftment in der Gruppe der Patienten, die ein erythrozytendepletiertes Knochenmarktransplantat erhielten, war statistisch signifikant ($p=0,007$) (siehe hierzu Abbildung 10 im Anhang).

3.12 Thrombozytenengraftment post transplantationem (Thrombozyten > 20/nl)

Bei den insgesamt 38 unverarbeiteten Knochenmarkspenden waren für 18 Transplantationen valide Daten zum Thrombozytenengraftment verfügbar. Für diese Transplantationen ergab sich im Median ein Thrombozytenengraftment am 22. Tag nach Transplantation mit einem Minimum von 11 und einem Maximum von 35 Tagen post transplantationem.

In der Gruppe der 34 erythrozytendepletierten Spenden waren für 19 Transplantationen Daten verfügbar. Dabei erfolgte das Thrombozytenengraftment in dieser Gruppe im Median nach 20 Tagen, mit einem Minimum von 14 und einem Maximum von 49 Tagen.

Statistisch ergab sich im Vergleich der Mediane beider Gruppen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Engraftments für Thrombozyten (siehe im Anhang Abbildung 11).

4 Diskussion

Im Bereich der Knochenmarktransplantation hat vor allem die allogene Transplantation in den letzten Jahren für eine Vielzahl maligner und nicht-maligner hämatologischer Erkrankungen zunehmend an Bedeutung gewonnen. Dies liegt zum einen an der stetig wachsenden Verfügbarkeit an bereitwilligen Fremdspendern und zum anderen an der sich verbessernden Kenntnis über zyto- und molekulargenetische Reaktionen und Risiken bei unterschiedlichen Spender- und Empfängerkonstellationen. In dieser Studie war eine etwaige Transplantatmodifikation aufgrund ABO-Blutgruppeninkompatibilität zwischen Spender und Empfänger und die möglichen Auswirkungen der Verarbeitung auf die Transplantatzusammensetzung sowie das Engraftment des Transplantates Gegenstand der Untersuchungen.

4.1 Diskussion der Methodik

In dieser analytischen retrospektiven Studie wurden Fälle mit Kontrollen bezüglich transplantationsspezifischer Einflussgrößen, d.h. verarbeitete mit unverarbeiteten Knochenmarkspenden, verglichen, die im Zuge einer Transplantation hämatopoietischer Stamm- und Progenitorzellen in einem definierten Zeitraum am Zentrum in Kiel, dokumentiert wurden.

Ein Vorteil der retrospektiven Datenerhebung ist die Möglichkeit, für ein spezifisches Patientenkollektiv (n=72 Patienten, die einer allogenen Knochenmarktransplantation unterzogen wurden) eines definierten Zeitraumes (2000-2013) im Rahmen der Fragestellung viele verschiedene Merkmale gleichzeitig analysieren zu können. Jedoch können bei einer retrospektiven Studie im Zuge der Datenerhebung auch Mängel in der Qualität der gewünschten Daten entstehen. Dies ist u.a. darin begründet, dass in diesem Fall die Datenerfassung aus der Dokumentation vergangener, möglicherweise lückenhaft aufgezeichneter Transplantationsprotokolle vollzogen wird. So müssen die Informationen aus bereits älterem Datenmaterial zusammengetragen werden, wobei fehlerhafte oder unvollständige Daten nicht immer vermieden werden können. Nicht (oder nicht vollständig) vorliegende Daten führen im Zweifelsfall zum Ausschluss des Patienten und verringern so die Patientenzahl. Aus diesem Grund ergeben sich auf der Basis der vorliegenden Daten auch für unsere Studie unterschiedliche Stichprobengrößen bei den Vergleichen unverarbeiteter mit verarbeiteten Spenden bezüglich bestimmter transplantationsspezifischer Merkmale. Dabei

bergen vor allem ungleiche Gruppengrößen den Nachteil, dass geringfügige Veränderungen in den anzahlmäßig kleinen Gruppen große Auswirkungen auf die Verteilung der Daten und damit auf die statistische Auswertung haben können.

Zusätzlich handelt es sich hier um eine monozentrische Studie der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie des Mildred-Scheel-Hauses am Standort Kiel. Daten, die diesem Studiendesign entstammen, spiegeln die Charakteristika des entsprechenden Transplantationszentrums in seiner Methode der Stammzellentnahme, ihrer hiernach erfolgenden Weiterverarbeitung und anschließenden Transfusion sowie seiner spezifischen Protokollierung wider (Dechartres et al., 2011). Im Gegensatz zu multizentrischen Studien, ist hier der direkte Ergebnisvergleich zu anderen Zentren nicht möglich, wodurch eventuelle zentrumsspezifische Datenausprägungen möglicherweise im Verborgenen bleiben. Andernfalls ist die Planung, Organisation, Durchführung und Auswertung einer monozentrischen Studie weniger aufwendig und somit auch kostengünstiger

4.2 AB0-Konstellation zwischen Spender und Empfänger

Entgegen landläufigen Annahmen stellt die Blutgruppenunverträglichkeit zwischen Spender und Empfänger aufgrund der für diese Fälle spezifisch möglichen Transplantatmodifikation heutzutage keine unüberwindbare Barriere mehr im Transplantationsprozess hämatopoietischer Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark dar.

In unserer retrospektiven Studie fand in 47% der Fälle die allogene KMT zwischen AB0-inkompatiblen Spendern und Empfängern statt. Von den insgesamt 72 in die Analyse einbezogenen Spenden wurden 17% AB0-Major-inkompatibel ($n = 12$), 25% AB0-Minor-inkompatibel ($n = 18$) sowie 5% AB0-Major- und Minor-inkompatibel ($n = 4$) transplantiert. Auch in der Literatur werden diese Häufigkeiten in vergleichbarem Umfang belegt. So beschreiben Worel und Kalhs ebenfalls ein AB0-Mismatch in 40-50% der Gesamtheit der HSZT. Hierbei entsprechen 20-25% aller HSZT einer AB0-Minor-Inkompatibilität. Die gleiche Prozentzahl entfällt auf die AB0-Major-Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger und auch für die kombinierte Inkompatibilität von Major und Minor geben die Autoren vergleichbare Zahlen an (Worel and Kalhs, 2008). Auch Kimura et al. führen in ihrem retrospektiven Studiendesign über den Einfluss der AB0-Inkompatibilität zwischen unverwandten Spendern und Empfängern auf das Ansprechen der Patienten im Anschluss an die Knochenmarktransplantation, vergleichbare Prozentzahlen für Japan auf (Kimura et al.,

2008). Sie geben in ihrer Studie eine ABO-Inkompatibilität für 49,2% an, dabei machen ABO-Major-Inkompatibilitäten 24,9%, ABO-Minor-Inkompatibilitäten 21,7% und kombinierte Major- und Minor-Inkompatibilitäten 2,6% der Fälle aus. Auch wenn mehrere vorangegangene Studien in der Literatur keinen nachteiligen Effekt auf das Ansprechen der Patienten nach einer ABO-inkompatiblen, allogenen Knochenmarktransplantation belegen können (Buckner et al., 1978, Bensinger et al., 1982, Hershko et al., 1980), sind die Risiken akuter und protrahierter hämolytischer Reaktionen belegt (Petz, 1998, Canals et al., 2004, Seebach et al., 2005). Die Reduktion des Risikos hämolytischer Komplikationen ist unter anderem der Grund für die Transplantataufarbeitung im Sinne einer Erythrozyten- und/oder Plasmadepletion mit resultierender Transplantatmodifikation in Volumen und Wirkstoffgehalt transplantationsspezifischer Zellen.

4.3 Knochenmarkvolumen vor und nach Verarbeitung

In der in Deutschland zurzeit gültigen zentralen Stellungnahme zur Transplantation hämatopoietischer Stamm- und Progenitorzellen sowie in den Richtlinien für Stammzelltransplantationen (www.bundesärztekammer.de, Richtlinie zur Herstellung und Anwendung von hämatopoietischen Stammzellzubereitungen vom 18.08.2014), wird für die allogene Knochenmarktransplantation ein Zielentnahmevolumen von 10-15 ml/kg KG des Spenders definiert, um die geforderte Mindesttransplantatdosis an Stammzellen von $2-3 \times 10^8$ NC/kg KG zu gewährleisten. Dies entspricht, je nach Gewichtskonstitution des Spenders, 1.000 bis 1.200 ml, wobei 1.500 ml im Gesamtentnahmevolumen nicht überschritten und 500 ml nicht unterschritten werden sollten (Goldman, 1994) (Kröger and Sputtek, 2011).

In der vorliegenden Studie lag das Gesamtvolumen aller entnommenen Spenden im Median bei 1.200 ml. Auch im Gruppenvergleich zwischen un- und weiterverarbeiteten Spenden ist in der Menge des Ausgangsvolumens kein signifikanter Unterschied zu finden (Median = 1.200 ml). Das für die Spende gewonnene Knochenmark entspricht somit der in den Richtlinien empfohlenen Entnahmemenge. Je nach ABO-Konstellation zwischen Spender und Empfänger erfolgte in unserer Studie eine Änderung des Volumens und der zellulären Zusammensetzung der Spende durch eine Erythrozyten- und/oder Plasmadepletion mittels COBE Spectra-Zellseparator. Es resultierte eine signifikante Volumenreduktion der verarbeiteten Spenden im Vergleich zu ihrem Ausgangsvolumen. In unserer Studie kam es durch die Transplantatverarbeitung zu einer deutlichen Volumenverminderung um 87% im

Median. Baker et al. führten in ihrer Studie 1991 über die Zellseparation an acht Knochenmarkspenden ebenfalls eine Reduktion des Transplantatvolumens um 87% auf (Baker et al., 1991). Eine vergleichbare Volumendepletion von 88% wurde auch durch Guttridge et al. in ihrer Studie an 88 Fällen beschrieben, in der der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Volumen- und Erythrozytendepletion mit dem COBE Spectra-Zellseparator vor der Transplantatgabe analysiert wurde (Guttridge et al., 2006). Desgleichen haben Soydan et al. über den Einfluss des Transplantatvolumens auf den Prozess der Erythrozytendepletion untersucht und vergleichbare Studienergebnisse publiziert. (Soydan et al., 2007)

Wir belegen somit eine signifikante Volumenreduktion der erythrozyten- bzw. plasmadepletierten Knochenmarkspenden um einen oben beschriebenen prozentualen Wert, der mit denen in der Literatur vergleichbar ist. In der weiteren Ausführung werden die Auswirkungen der Volumenreduktion auf die zelluläre Zusammensetzung und das Engraftment des Transplantates diskutiert.

4.4 Wirkstoffgehalt der nukleären und der CD34-positiven Zellen im Transplantat

Für eine erfolgreiche hämatologische und immunologische Rekonstitution wird durch nationale Transplantationsrichtlinien, die in Einklang mit der internationalen Literatur stehen, eine Transplantatdosis hämatopoietischer Stammzellen von mindestens 2×10^6 CD34-positiven Zellen/kg KG des Empfängers empfohlen (Mavroudis et al., 1996, Uharek et al., 1992), wenn die Stamm- und Progenitorzellen aus dem peripheren Blut gewonnen wurden. Für das Knochenmarkblut des Spenders indes liegen die meisten Daten für den Gehalt nukleärer Zellen und nicht für CD34-positive Zellen/kg KG des Empfängers vor, sodass man für Transplantate hämatopoietischer Stamm- und Progenitorzellen gewonnen aus dem Knochenmark eine Mindestdosis von $2-3 \times 10^8$ NC definiert hat (Kiefel 2010).

In dieser Studie stimmt der Median der NC/kg KG für die unverarbeiteten Spenden mit dem der prozessierten Spenden vor deren Verarbeitung überein und liegt mit $3,15$ und $3,6 \times 10^8$ nukleären Zellen/kg des Körpergewichtes des Empfängers im Bereich der für die Transplantation empfohlenen Mindestdosis. Auffällig ist in der weiteren Betrachtung der Verlust der NC im Vergleich der Mediane vor und nach Verarbeitung um etwa 58%, von $3,6 \times 10^8$ auf $1,5 \times 10^8$ NC/kg KG des Empfängers. Die empfohlene Mindestdosis der NC konnte

somit aufgrund des starken Zellverlustes unter der Transplantataufarbeitung nicht mehr eingehalten werden. Dieser Zellverlust ist allerdings technisch bedingt zu erwarten, da der Zellseparator im Rahmen der Sammlung primär mononukleäre Zellen sammelt und andere kernhaltige Zellen präferentiell zurücklässt. Somit kommt es zwar absolut gesehen zu einem Zellverlust, aber relativ betrachtet, zu einer Anreicherung mononukleärer Zellen, einer Zellfraktion, in der hinsichtlich der Dichte hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen zu finden sind. Auch die Wiederfindungsrate, die sogenannte Zellrecovery der NC, ergibt einen Wert von 41% im Median nach Verarbeitung und bestätigt den erwähnten nukleären Zellverlust nach Transplantatverarbeitung. Vergleichbare Angaben zur Recovery nukleärer Zellen nach Transplantataufarbeitung werden ebenfalls in der Literatur beschrieben (Larghero et al., 2006, Schwella et al., 1996, Tsubaki et al., 2001) und bestätigen somit die Verminderung der NC durch die Transplantatverarbeitung in der vorliegenden Arbeit.

Betrachtet man die Anzahl der CD34-positiven Zellen für die unverarbeiteten Spenden und für die Transplantate vor geplanter Verarbeitung, so liegt diese für unsere Studie mit $2-3 \times 10^6$ Zellen/kg KG des Empfängers im Bereich der für Knochenmark geltenden Standardanforderungen mit einer Mindestdosis im Produkt von $>1,5 \times 10^6$ CD34-positiven Zellen/kg KG. Im Gegensatz zum signifikanten Verlust der NC im Rahmen der Verarbeitung, zeigen die hier zusammengestellten Daten, dass die Anzahl CD34-positiver Zellen im Median sogar einen leichten Anstieg um ca. 18% im Verlauf der Verarbeitung aufweisen. Auch die Recovery der Anzahl CD34-positiver Zellen zeigt in der vorliegenden Studie nach Produktverarbeitung mit 112% einen Anstieg der Zellen. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens liegt in der Bestimmung der CD34-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie, der Standardmethode zur Bestimmung des hämatopoetischen Potentials von Stammzellpräparaten. Dieses Verfahren ermöglicht die Analyse von molekularen und physikalischen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Anhand von Form, Struktur und Färbung können Aussagen zu bestimmten Zelleigenschaften getroffen werden. Eine wie in unserer Arbeit beschriebene höhere Anzahl CD34-positiver Zellen nach erfolgter Produktverarbeitung kann so fälschlicherweise durch strukturelle Ähnlichkeit anderer Zellpopulationen, wie beispielsweise den CD34-positiven Zellen morphologisch vergleichbaren Erythroblasten hervorgerufen werden. Es ist auch denkbar, dass die Zellen durch die substantielle Abreicherung von Thrombozyten und nicht-mononukleären Zellen nach der Verarbeitung besser färb- und detektierbar werden, so dass nur eine scheinbare Vermehrung stattfindet. Vielmehr wäre unter den Transplantatverarbeitungsschritten

bestenfalls mit einer Recovery von 100% oder aber, ähnlich wie bei den NC, mit einem Zellverlust zu rechnen. Itoh et al. beobachteten in ihrer Studie eine Recovery der CD34-positiven Zellen nach COBE Spectra-Erythrozytendepletion zwischen 85-92% (Itoh et al., 2006). Auch in den Studien von Guttridge et al. sowie Koristek und Mayer werden für die Anzahl CD34-positiver Zellen Recoverywerte zwischen 77-88% im Median beschrieben (Guttridge et al., 2006, Koristek and Mayer, 1999).

Aus den Ergebnissen unserer Studie, mit dem deutlichen Verlust von NC nach der Erythrozyten- und/oder Plasmadepletion mit COBE Spectra-Zellseparator unterhalb der empfohlenen Mindesttransplantatdosis, ergibt sich die Forderung nach einem alternativen Parameter für die Qualitätsbeurteilung hinsichtlich des Wirkstoffgehaltes bei hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellprodukten, gewonnen aus dem Knochenmark. Um eine erfolgreiche Transplantation zu garantieren, gelten für hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellprodukte, die aus dem peripheren Blut gewonnen werden, Mindesttransplantationsdosen, definiert anhand der CD34-positiven Zellen/kg KG des Empfängers. In unserer Studie scheinen die CD34-positiven Zellen durch die Verarbeitung in ihrem Wert pro kg Körpergewicht weitestgehend unbeeinflusst zu sein und entsprechen vor sowie nach Erythrozytendepletion der in gültigen Richtlinien bzw. zentralen Gutachten empfohlenen Mindesttransplantatdosis. Somit scheint auch für Stamm- und Progenitorzellprodukte aus dem Knochenmark die Dosis CD34-positiver Zellen/kg Körpergewicht des Empfängers ein verlässlicher Marker zur Beurteilung ihrer hämatopoetischen Potenz zu sein.

4.5 Erythrozytenvolumen und Hämatokritwerte

Eine Erythrozytenreduktion im Endprodukt ist im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen und untersuchten Konstellation (AB0-Major-, Minor- oder kombinierte Inkompatibilität) entscheidend, da sie für die Verträglichkeit der Knochenmarkstransplantate zwischen Spender und Empfänger eine essentielle Rolle spielt und für die Verminderung gravierender Nebenwirkungen unerlässlich ist. So vermindert die Depletion der Erythrozyten im Falle einer AB0-Major-Inkompatibilität und die Depletion des Plasmas bei AB0-Minor-Inkompatibilität das Risiko einer akuten oder protrahierten Hämolyse.

In unserer Studie erfolgte für die weiterverarbeiteten Spenden die Depletion der Erythrozyten und somit konsekutiv des Erythrozytenvolumens mittels des COBE Spectra-Zellseparators

um im Median 98% auf ein medianes Restvolumen im Stammzellprodukt von 7 ml. Dies entsprach im Median 0,15 ml potentiell inkompatibler Erythrozyten/kg KG des Empfängers. Somit befanden sich die manipulierten Transplantate im empfohlenen Zielbereich von insgesamt < 20 ml Erythrozytenrestvolumen bzw. von maximal 0,25 – 0,5 ml inkompatibler Erythrozyten/kg Körpergewicht des Empfängers für das zu transfundierende Stammzellprodukt bei Blutgruppeninkompatibilität.

Die Verminderung der Erythrozyten im Transplantat korreliert auch mit der zu beobachtenden medianen Verringerung des Hämatokritwertes um 87%. Guttridge et al. beschreiben in ihrer Studie über den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Erythrozytendepletion mit dem COBE Spectra-Zellseparator ebenfalls eine Erythrozytenreduktion um 98% auf 5 ml Restvolumen. Sie führen weiterhin an, dass Erythrozytenvolumina dieser Größenordnung im Endprodukt die gefürchteten Risiken einer blutgruppeninkompatiblen Knochenmarktransplantation zwischen Spender und Empfänger weitestgehend minimieren bzw. praktisch ausschließen (Guttridge et al., 2006).

4.6 Transplantatengraftment

Über den Erfolg einer allogenen Knochenmarktransplantation entscheidet letztendlich das möglichst störungsfrei ablaufende „Einnisten“ und Anwachsen der HSC im Empfänger mit einer anschließenden Normalisierung der Knochenmarkzellularität und Wiedererlangung einer kompletten Hämatopoiese. Auch wenn die AB0- Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger in der Knochenmarktransplantationsmedizin kein Hindernis darstellt, wurde in vergangenen Studien bei einer AB0-Major-Inkompatibilität ein verzögertes Transplantatengraftment, vor allem der roten Blutkörperchen, beobachtet (Rabitsch et al., 2003, Stussi et al., 2002, Bolan et al., 2001b).

In unserer Studie wurde vergleichend das Thrombozyten- und Leukozytenengraftment zwischen unverarbeiteten und depletierten Knochenmarkspenden untersucht. Für das Thrombozytenengraftment (> 20 Thrombozyten/nl) ergibt sich in der vorliegenden Arbeit zwischen den beiden Gruppen, den unverarbeiteten Spenden versus den erythrozytendepletierten Transplantaten mit 22 bzw. 20 Tagen, kein signifikanter Unterschied. Anders verhält es sich hingegen für das Leukozytenengraftment zwischen den unverarbeiteten und den depletierten Spenden. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied von drei Tagen zwischen den beiden Gruppen. Das Leukozytenengraftment nach

Transplantation wurde in der Patientengruppe, die verarbeitete Spenden erhielt, mit im Median 21,5 Tage, drei Tage später erreicht als in der Patientengruppe, die mit unmanipulierten Produkten transplantiert worden war. In mehreren vorangegangenen Studien wurde das Engraftment der Thrombozyten und Leukozyten mit der Anzahl der CD34-positiven Stammzellen je kg KG des Empfängers korreliert. In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Menge der pro kg KG transplantierten CD34-positiven Zellen die Zeit zum Leukozyten- und Thrombozytenengraftment maßgeblich beeinflusst. Bittencourt et al. zeigten in ihrer Studie über den Einfluss der CD34-positiven Stammzelldosis je kg KG des Empfängers auf die hämatopoietische Rekonstitution nach erfolgter Transplantation unmanipulierten allogenen Knochenmarks, dass die Transfusion von 3×10^6 CD34-positiven Zellen zur Beschleunigung des Engraftments aller Zellreihen führt (Bittencourt et al., 2002). Bittencourts Beobachtungen stützten sich auf die Aussagen der Studie Singhals et al., die unter einer geringeren Transplantatdosis von $< 2 \times 10^6$ CD34-positiven Zellen ein schlechteres Ansprechen der Patienten post transplantationem anführten (Singhal et al., 2000).

In unserer Studie ergibt sich für die Transplantatdosis der CD34-positiven Zellen kein signifikanter Unterschied zwischen den unverarbeiteten Spenden und denen, die einer Erythrozytendepletion unterzogen wurden. Im Median wurden die Patienten mit Produkten transplantiert, die einen Wert zwischen $2-3 \times 10^6$ CD34-positiven Zellen/kg KG des Empfängers aufwiesen. Somit wären nach Aussage der vorangegangenen Studien mit einer CD34-positiven Zelldosis im empfohlenen Zielbereich keine Auffälligkeiten im Engraftmentprozess zu erwarten. Dennoch sehen wir ein verzögertes Leukozytenengraftment für die Gruppe der Patienten, die erythrozytendepletierte Produkte erhielten. Sicherlich sind das Engraftment und das Gesamtüberleben von Patienten nach allogener Stamm- und Progenitorzelltransplantation nicht unifaktoriell begründet, sodass mit dem gefundenen, statistisch signifikanten Ergebnis nicht zwangsläufig eine Kausalität bewiesen ist. Auf das Engraftment haben weitere Faktoren wie HLA-Kompatibilität, Konditionierung und Immunsuppression einen Einfluss. Aufgrund der geringen Patientenzahl in dieser Studie war aber eine multivariate Betrachtung nicht möglich.

5 Zusammenfassung

Die allogene Transplantation hämatopoietischer Stamm- und Progenitorzellen aus dem peripheren Blut oder aus dem Knochenmark von verwandten und unverwandten Spendern ist ein etabliertes Verfahren in der Behandlung verschiedener Erkrankungen des blutbildenden Systems. Eine Blutgruppenunverträglichkeit zwischen Spender und Empfänger stellt heutzutage keine Barriere mehr für die Durchführung einer erfolgreichen Knochenmarktransplantation dar. Dennoch ist die ABO-inkompatible Transplantation mit der Folge einer möglichen Hämolyse, akut im Transplantationsprozess, oder verzögert während der einsetzenden hämatopoietischen und immunologischen Rekonstitution, mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko vergesellschaftet. Die Erythrozyten- und/oder Plasmadepletion des Knochenmarkproduktes bei ABO-Blutgruppeninkompatibilität zwischen Spender und Empfänger hat das Ziel, das Risiko einer akuten oder protrahierten Hämolyse weitestgehend zu minimieren. In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob die Manipulation des Transplantates durch Erythrozyten- und/oder Plasmadepletion einen signifikanten Effekt auf Produktparameter wie das Volumen, den Hämatokrit, das Erythrozytenvolumen sowie die zelluläre Zusammensetzung hat und ob dies gegebenenfalls einen Einfluss auf die Ergebnisse der Transplantation hat. Anhand der Daten von archivierten Transplantationsprotokollen der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie des Mildred-Scheel-Hauses, Campus Kiel, wurden Daten von 72 Patienten untersucht, die im Zeitraum von 2000 bis 2013 eine allogene Knochenmarktransplantation erhalten hatten. Hiervon wurden 38 Spenden unverarbeitet transfundiert und 34 Spenden bei ABO-Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger einer Prozessierung unterzogen. Dabei zeigte sich, dass die Erythrozyten- und/oder Plasmadepletion zu einem signifikanten Verlust nukleärer Zellen und von CD45-positiven Zellen unter die empfohlene Mindesttransplantatdosis von $2-3 \times 10^8$ nukleären Zellen/kg KG des Empfängers führt. Gleichzeitig kam es zu einer signifikanten ($p=0,0001$) Volumeneinengung des Produktes. Die Anzahl der CD34-positiven Zellen blieb unter der Verarbeitung weitestgehend konstant. Gleichzeitig waren sowohl der Hämatokrit als auch das Erythrozytenvolumen in den Transplantaten nach Erythrozyten- und/oder Plasmadepletion signifikant ($p=0,0001$) geringer im Vergleich zu den Produktparametern vor Verarbeitung und gegenüber Produkten, die keiner Verarbeitung

unterzogen worden waren. Im Rahmen des Engraftments ergab sich ein signifikant späteres Leukozytenengraftment bei Patienten, die ein erythrozytendepletiertes Produkt erhalten hatten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das Verfahren der Erythrozyten- und/oder Plasmadepletion zu signifikanten Veränderungen der Transplantate führt. Dabei ist ein kritischer Punkt, dass nach der Verarbeitung in einem beträchtlichen Anteil der Produkte nicht mehr die in Richtlinien sowie in einer zentralen Stellungnahme hinterlegte Mindestdosis nukleärer Zellen/kg KG des Empfängers erreicht wird. Stattdessen sollte in Zukunft erwogen werden, für derartige manipulierte Produkte die Anzahl der CD34-positiven Zellen/kg KG des Empfängers, die durch die Manipulation nicht gemindert wurde, als Maß für die Güte bzw. den Wirkstoffgehalt von Knochenmarktransplantaten heranzuziehen. Um dieses Ergebnis zu erhärten oder weiter abzuklären, wäre sicherlich eine multizentrische Analyse derartiger Daten und weiterer potentieller Einflussgrößen an größeren Patientenkollektiven wünschenswert und zu fördern.

6 Literatur

- Alison, M. R., Britain, M., Lovell, M. J. & Wright, N. A. 2006. Markers of adult tissue-based stem cells. *Handb Exp Pharmacol*, 185-227.
- Anasetti, C., Amos, D., Beatty, P. G., Appelbaum, F. R., Bensinger, W., Buckner, C. D., Clift, R., Doney, K., Martin, P. J., Mickelson, E. & et al. 1989. Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *N Engl J Med*, 320, 197-204.
- Arguello, J. R., Little, A. M., Bohan, E., Gallardo, D., O'Shea, J., Dodi, I. A., Goldman, J. M. & Madrigal, J. A. 1998. A high resolution HLA class I and class II matching method for bone marrow donor selection. *Bone Marrow Transplant*, 22, 527-34.
- Aversa, F., Tabilio, A., Velardi, A., Cunningham, I., Terenzi, A., Falzetti, F., Ruggeri, L., Barbabietola, G., Aristei, C., Latini, P., Reisner, Y. & Martelli, M. F. 1998. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med*, 339, 1186-93.
- Baker, P. K., Rhodes, E. G. & Duguid, J. K. 1991. Continuous flow cell separator use for bone marrow processing. *Transfus Sci*, 12, 183-7.
- Barnes, D. W.H., Corp, M.J., Loutit, J.F. & Neal F.E. 1956. Treatment of murine leukaemia with x-Rays and homologous bone marrow. *Br Med J*. 2(4993), 626-7
- Bensinger, W. I., Buckner, C. D., Thomas, E. D. & Clift, R. A. 1982. AB0-incompatible marrow transplants. *Transplantation*, 33, 427-9.
- Bensinger, W. I., Longin, K., Appelbaum, F., Rowley, S., Weaver, C., Lilleby, K., Gooley, T., Lynch, M., Higano, T., Klarnet, J. & 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, 825-31.
- Berenson, R. J., Andrews, R. G., Bensinger, W. I., Kalamasz, D., Knitter, G., Buckner, C. D. & Bernstein, I. D. 1988. Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J Clin Invest*, 81, 951-5.
- Bittencourt, H., Rocha, V., Chevret, S., Socie, G., Esperou, H., Devergie, A., Dal Cortivo, L., Marolleau, J. P., Garnier, F., Ribaud, P. & Gluckman, E. 2002. Association of CD34 cell dose with hematopoietic recovery, infections, and other outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*, 99, 2726-33.
- Bolan, C. D., Childs, R. W., Procter, J. L., Barrett, A. J. & Leitman, S. F. 2001a. Massive immune haemolysis after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with minor AB0 incompatibility. *Br J Haematol*, 112, 787-95.
- Bolan, C. D., Leitman, S. F., Griffith, L. M., Wesley, R. A., Procter, J. L., Stroncek, D. F., Barrett, A. J. & Childs, R. W. 2001b. Delayed donor red cell chimerism and pure red cell aplasia following major AB0-incompatible nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 98, 1687-94.
- Bonnet, D. 2002. Haematopoietic Stem Cells. *J Pathol*, 197, 430-40.

- Brown, J., Greaves, M. F. & Molgaard, H. V. 1991. The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *Int Immunol*, 3, 175-84.
- Broxmeyer, H. E., Gluckman, E., Auerbach, A., Douglas, G. W., Friedman, H., Cooper, S., Hangoc, G., Kurtzberg, J., Bard, J. & Boyse, E. A. 1990. Human umbilical cord blood: a clinically useful source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Int J Cell Cloning*, 8 Suppl 1, 76-89; discussion 89-91.
- Buckner, C. D., Clift, R. A., Sanders, J. E., Williams, B., Gray, M., Storb, R. & Thomas, E. D. 1978. ABO-incompatible marrow transplants. *Transplantation*, 26, 233-8.
- Canals, C., Muniz-Diaz, E., Martinez, C., Martino, R., Moreno, I., Ramos, A., Arilla, M., Boto, N., Pastoret, C., Remacha, A., Sierra, J. & Madoz, P. 2004. Impact of ABO incompatibility on allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation after reduced intensity conditioning. *Transfusion*, 44, 1603-11.
- Civin, C. I., Strauss, L. C., Brovall, C., Fackler, M. J., Schwartz, J. F. & Shaper, J. H. 1984. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol*, 133, 157-65.
- Davies, S. M., Weisdorf, D. J., Haake, R. J., Kersey, J. H., Mcglave, P. B., Ramsay, N. K. & Blazar, B. R. 1994. Second infusion of bone marrow for treatment of graft failure after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 14, 73-7.
- Dechartres, A., Boutron, I., Trinquart, L., Charles, P. & Ravaud, P. 2011. Single-center trials show larger treatment effects than multicenter trials: evidence from a meta-epidemiologic study. *Ann Intern Med*, 155, 39-51.
- Deutsches Ärzteblatt 18. August 2014 DOI: 10.3238/arztebl.2014.rl_haematop_sz01
- Dexter, T. M. & Testa, N. G. 1976. Differentiation and proliferation of hemopoietic cells in culture. *Methods Cell Biol.* 14, 387-405.
- Dingli, D. & Pacheco, J., M. 2010. Modelling the architecture and dynamics of hematopoiesis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.*2, 235-44
- Dohner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., Dohner, K., Bentz, M. & Lichter, P. 2000. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 343, 1910-6.
- Donohue, J., Homge, M. & Kernan, N. A. 1993. Characterization of cells emerging at the time of graft failure after bone marrow transplantation from an unrelated marrow donor. *Blood*, 82, 1023-9.
- El Kassar, N., Legouvello, S., Joseph, C. M., Salesses, P., Rieux, C., Cordonnier, C., Vernant, J. P., Farcet, J. P., Bierling, P. & Kuentz, M. 2001. High resolution HLA class I and II typing and CTLp frequency in unrelated donor transplantation: a single-institution retrospective study of 69 BMTs. *Bone Marrow Transplant*, 27, 35-43.
- Ferrara, J. L. & Deeg, H. J. 1991. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med*, 324, 667-74.
- Ferrara, J. L. & Reddy, P. 2006. Pathophysiology of graft-versus-host disease. *Semin Hematol*, 43, 3-10.

- Fina, L., Molgaard, H. V., Robertson, D., Bradley, N. J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D. R., Baker, M. A. & Greaves, M. F. 1990. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*, 75, 2417-26.
- Forraz, N., Pettengell, R., Deglesne, P. A., McGuckin, C. P., 2002. AC133+ umbilical cord blood progenitors demonstrate rapid self-renewal and low apoptosis. *Br J Haematol*, 119(2): p.516-24.
- Ford, C.E., Hamerton, J.L., Barnes, D.W. Loutit, J.F: 1956. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*, 177, 452-4.
- Gajewski, J. L., Petz, L. D., Calhoun, L., O'rourke, S., Landaw, E. M., Lyddane, N. R., Hunt, L. A., Schiller, G. J., Ho, W. G. & Champlin, R. E. 1992. Hemolysis of transfused group O red blood cells in minor AB0-incompatible unrelated-donor bone marrow transplants in patients receiving cyclosporine without posttransplant methotrexate. *Blood*, 79, 3076-85.
- Goker, H., Haznedaroglu, I. C. & Chao, N. J. 2001. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp Hematol*, 29, 259-77.
- Goldman, J. M. 1994. A special report: bone marrow transplants using volunteer donors--recommendations and requirements for a standardized practice throughout the world--1994 update. The WMDA Executive Committee. *Blood*, 84, 2833-9.
- Gorgens, A., Radtke, S., Mollmann, M., Cross, M., Durig, J., Horn, P.A., Giebel, B., 2013. Revision of the human hematopoietic tree: granulocyte subtypes derive from distinct hematopoietic lineages. *Cell Rep*, 3, 1539-52.
- Gratwohl, A., Baldomero, H., Gratwohl, M., Aljurf, M., Bouzas, L. F., Horowitz, M., Kadera, Y., Lipton, J., Iida, M., Pasquini, M. C., Passweg, J., Szer, J., Madrigal, A., Frauendorfer, K. & Niederwieser, D. 2013. Quantitative and qualitative differences in use and trends of hematopoietic stem cell transplantation: a Global Observational Study. *Haematologica*, 98, 1282-90.
- Gratwohl, A., Baldomero, H., Horisberger, B., Schmid, C., Passweg, J. & Urbano-Ispizua, A. 2002. Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood*, 100, 2374-86.
- Guttridge, M. G., Sidders, C., Booth-Davey, E., Pamphilon, D. & Watt, S. M. 2006. Factors affecting volume reduction and red blood cell depletion of bone marrow on the COBE Spectra cell separator before haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 38, 175-81.
- Handgretinger, R., Lang, P., 2008. The history and future prospective of haplo-identical stem cell transplantation. *Cytotherapie*, 10, 443-51.
- Hershko, C., Gale, R. P., Ho, W. & Fitch, J. 1980. ABH antigens and bone marrow transplantation. *Br J Haematol*, 44, 65-73.
- Ho, V. T. & Soiffer, R. J. 2001. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 98, 3192-204.
- Hoodin, F. & Weber, S. 2003. A systematic review of psychosocial factors affecting survival after bone marrow transplantation. *Psychosomatics*, 44, 181-95.

- Horowitz, M. M. & Rowings, P. A. 1997. An update from the International Bone Marrow Transplant Registry and the Autologous Blood and Marrow Transplant Registry on current activity in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol*, 4, 395-400.
- Itoh, T., Minegishi, M., Kudo, Y., Saito, N., Takahashi, H., Suzuki, A., Narita, A., Sato, Y., Miura, J., Inoue, Y., Kameoka, J., Suwabe, N., Imaizumi, M., Okuda, M. & Tsuchiya, S. 2006. Predictive value of the original content of CD34(+) cells for enrichment of hematopoietic progenitor cells from bone marrow harvests by the apheresis procedure. *J Clin Apher*, 21, 176-80.
- Jakobson D. A., Vogelsang G. B., 2007. Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis.*,2:35.
- Kimura, F., Sato, K., Kobayashi, S., Ikeda, T., Sao, H., Okamoto, S., Miyamura, K., Mori, S., Akiyama, H., Hirokawa, M., Ohto, H., Ashida, H., Motoyoshi, K., 2008. Impact of ABO-blood group incompatibility on the outcome of recipients of bone marrow transplants from unrelated donors in the Japan Marrow Donor Program. *Haematologica*, 93, 1686-93.
- Kiefel, V. 2010. Transfusionsmedizin und Immunhämatologie Grundlagen -Therapie- Methodik Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Kiss, J. E., Rybka, W. B., Winkelstein, A., Demagalhaes-Silverman, M., Lister, J., D'andrea, P. & Ball, E. D. 1997. Relationship of CD34+ cell dose to early and late hematopoiesis following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 19, 303-10.
- Klein, J. & Sato, A. 2000. The HLA System. First Of Two Parts. *N Engl J Med*, 343, 702-9.
- Korbling, M. & Anderlini, P. 2001. Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? *Blood*, 98, 2900-8.
- Korbling, M., Huh, Y. O., Durett, A., Mirza, N., Miller, P., Engel, H., Anderlini, P., Van Besien, K., Andreeff, M., Przepiorka, D., Deisseroth, A. B. & Champlin, R. E. 1995. Allogeneic blood stem cell transplantation: peripheralization and yield of donor-derived primitive hematopoietic progenitor cells (CD34+ Thy-1dim) and lymphoid subsets, and possible predictors of engraftment and graft-versus-host disease. *Blood*, 86, 2842-8.
- Koristek, Z. & Mayer, J. 1999. Bone marrow processing for transplantation using the COBE spectra cell separator. *J Hematother Stem Cell Res*, 8, 443-8.
- Kröger N, Sputtek A. 3. Stammzellquelle. In: Kröger N, Hrsg. Allogene Stammzelltherapie. Grundlagen, Indikationen und Perspektiven. 3. Aufl. Bremen [u.a.]: UNI-MED-Verl.; 2011: 24-35.
- Larghero, J., Rea, D., Esperou, H., Biscay, N., Maurer, M. N., Lacassagne, M. N., Ternaux, B., Traineau, R., Yakouben, K., Dosquet, C., Socie, G., Gluckman, E., Benbunan, M. & Marolleau, J. P. 2006. ABO-mismatched marrow processing for transplantation: results of 114 procedures and analysis of immediate adverse events and hematopoietic recovery. *Transfusion*, 46, 398-402.
- Lie, A. K. & To, L. B. 1997. Peripheral Blood Stem Cells: Transplantation and Beyond. *Oncologist*, 2, 40-49.

- Ljungman, P., Bregni, M., Brune, M., Cornelissen, J., De Witte, T., Dini, G., Einsele, H., Gaspar, H. B., Gratwohl, A., Passweg, J., Peters, C., Rocha, V., Saccardi, R., Schouten, H., Sureda, A., Tichelli, A., Velardi, A. & Niederwieser, D. 2010. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone Marrow Transplant*, 45, 219-34.
- Loken, M. R., Shah, V. O., Dattilio, K. L. & Civin, C. I. 1987. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood*, 70, 1316-24.
- Marks, D. I., Aversa, F. & Lazarus, H. M. 2006. Alternative donor transplants for adult acute lymphoblastic leukaemia: a comparison of the three major options. *Bone Marrow Transplant*, 38, 467-75.
- Mavroudis, D., Read, E., Cottler-Fox, M., Couriel, D., Mollrem, J., Carter, C., Yu, M., Dunbar, C. & Barrett, J. 1996. CD34+ cell dose predicts survival, posttransplant morbidity, and rate of hematologic recovery after allogeneic marrow transplants for hematologic malignancies. *Blood*, 88, 3223-9.
- Mickelson, E. M., Petersdorf, E. W. & Hansen, J. A. 2002. HLA matching and hematopoietic cell transplant outcome. *Clin Transpl*, 263-71.
- Mueller-Eckhardt, C. 2003 Transfusionsmedizin. Springer, 3. Auflage Edition 2003
- Narayan, A. D., Ersek, A., Campbell, T. A., Colon, D. M., Pixley, J. S. & Zanjani, E. D. 2005. The effect of hypoxia and stem cell source on haemoglobin switching. *Br J Haematol*, 128, 562-70.
- Passweg, J. R., Baldomero, H., Bader, P., Bonini, C., Cesaro, S., Dreger, P., Duarte, R. F., Dufour, C., Falkenburg, J. H., Farge-Bancel, D., Gennery, A., Kroger, N., Lanza, F., Nagler, A., Sureda, A. & Mohty, M. 2015. Hematopoietic SCT in Europe 2013: recent trends in the use of alternative donors showing more haploidentical donors but fewer cord blood transplants. *Bone Marrow Transplant*, 50, 476-82.
- Passweg, J. R., Baldomero, H., Peters, C., Gaspar, H. B., Cesaro, S., Dreger, P., Duarte, R. F., Falkenburg, J. H., Farge-Bancel, D., Gennery, A., Halter, J., Kroger, N., Lanza, F., Marsh, J., Mohty, M., Sureda, A., Velardi, A. & Madrigal, A. 2014. Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2012 with special consideration of pediatric transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 49, 744-50.
- Petz, L. D. 1987. Immunohematologic problems associated with bone marrow transplantation. *Transfus Med Rev*, 1, 85-100.
- Petz, L. D. 1998. Hemolysis associated with transplantation. *Transfusion*, 38, 224-8.
- Pidala, J. & Anasetti, C. 2010. Can antigen-specific regulatory T cells protect against graft versus host disease and spare anti-malignancy alloresponse? *Haematologica*, 95, 660-5.
- Rabitsch, W., Knobl, P., Prinz, E., Keil, F., Greinix, H., Kalhs, P., Worel, N., Jansen, M., Horl, W. H. & Derfler, K. 2003. Prolonged red cell aplasia after major ABO-incompatible allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: removal of persisting isohemagglutinins with Ig-Therasorb immunoadsorption. *Bone Marrow Transplant*, 32, 1015-9.
- Rieger, M., & Schröder, T. D. 2007 Hämatopoetische Stammzellen. BioSpektrum, 13. Jahrgang, 03.07, pp254-256.

- Schofield, R. 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 4, 7-25.
- Schreuder, G. M., Hurley, C. K., Marsh, S. G., Lau, M., Fernandez-Vina, M. A., Noreen, H. J., Setterholm, M. & Maiers, M. 2005. HLA dictionary 2004: summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. *Hum Immunol*, 66, 170-210.
- Schwella, N., Heuft, H. G., Rick, O., Blasczyk, R., Wittmann, G. & Huhn, D. 1996. Analysis for recovery and loss of mononuclear cells and colony-forming units granulocyte-macrophage during ex vivo processing of autologous bone marrow. *Vox Sang*, 70, 132-8.
- Seebach, J. D., Stussi, G., Passweg, J. R., Loberiza, F. R., Jr., Gajewski, J. L., Keating, A., Goerner, M., Rowlings, P. A., Tiberghien, P., Elfenbein, G. J., Gale, R. P., Van Rood, J. J., Reddy, V., Gluckman, E., Bolwell, B. J., Klumpp, T. R., Horowitz, M. M., Ringden, O. & Barrett, A. J. 2005. ABO blood group barrier in allogeneic bone marrow transplantation revisited. *Biol Blood Marrow Transplant*, 11, 1006-13.
- Singhal, S., Powles, R., Treleaven, J., Kulkarni, S., Sirohi, B., Horton, C., Millar, B., Shepherd, V., Tait, D., Saso, R., Rowland, A., Long, S., Mehta, J. 2000. A low CD34+ cell dose results in higher mortality and poorer survival after blood or marrow stem cell transplantation from HLA-identical siblings: should 2 x 10(6) CD34+ cells/kg be considered the minimum threshold? *Bone Marrow Transplant*, 26, 489-96.
- Smith, C. 2003. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control*, 10, 9-16.
- Soydan, E., Ayyildiz, E., Dalva, K., Topcuoglu, P., Tol, M., Arslan, O., Ilhan, O. & Arat, M. 2007. Impact of harvest product volume in erythrocyte depletion of allogeneic or autologous bone marrow using COBE spectra. *Transfus Apher Sci*, 36, 269-73.
- Storek, J. 2008. Immunological reconstitution after hematopoietic cell transplantation - its relation to the contents of the graft. *Expert Opin Biol Ther*, 8, 583-97.
- Stussi, G., Halter, J., Bucheli, E., Valli, P. V., Seebach, L., Gmur, J., Gratwohl, A., Schanz, U., Passweg, J. R. & Seebach, J. D. 2009. Prevention of pure red cell aplasia after major or bidirectional ABO blood group incompatible hematopoietic stem cell transplantation by pretransplant reduction of host anti-donor isoagglutinins. *Haematologica*, 94, 239-48.
- Stussi, G., Muntwyler, J., Passweg, J. R., Seebach, L., Schanz, U., Gmur, J., Gratwohl, A. & Seebach, J. D. 2002. Consequences of ABO incompatibility in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 30, 87-93.
- Sulahian, A., Boutboul, F., Ribaud, P., Leblanc, T., Lacroix, C. & Derouin, F. 2001. Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. *Cancer*, 91, 311-8.
- Sun, Y., Tawara, I., Toubai, T. & Reddy, P. 2007. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease: recent advances. *Transl Res*, 150, 197-214.
- Tan, B. T., Park, C. Y., Ailles, L. E. & Weissman, I. L. 2006. The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Lab Invest*, 86, 1203-7.
- Thomas, E. D., Lochte, H. L. Jr., Lu, W.C., Ferrebee, J. W., 1957. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *New England Journal*, 257, 491-6.

- Tsubaki, K., Ariyama, T., Ueno, T., Kogi, Y., Itoh, S., Kanemitsu, Y., Ashida, T. & Kanamaru, A. 2001. Concentration of progenitor cells collected from bone marrow fluid using a continuous flow cell separator. *Ther Apher*, 5, 46-8.
- Uharek, L., Gassmann, W., Glass, B., Steinmann, J., Loeffler, H. & Mueller-Ruchholtz, W. 1992. Influence of cell dose and graft-versus-host reactivity on rejection rates after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 79, 1612-21.
- Urbano-Ispizua, A., Schmitz, N., De Witte, T., Frassoni, F., Rosti, G., Schrezenmeier, H., Gluckman, E., Friedrich, W., Cordonnier, C., Socie, G., Tyndall, A., Niethammer, D., Ljungman, P., Gratwohl, A., Apperley, J., Niederwieser, D. & Bacigalupo, A. 2002. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant*, 29, 639-46.
- Vargas-Diez, E., Fernandez-Herrera, J., Marin, A., Camara, R. & Garcia-Diez, A. 2003. Analysis of risk factors for acute cutaneous graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Dermatol*, 148, 1129-34.
- Vogelsang, G. B., Lee, L. & Bensen-Kennedy, D. M. 2003. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med*, 54, 29-52.
- Worel, N. & Kalhs, P. 2008. ABO-incompatible allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*, 93, 1605-7.
- Worel, N., Kalhs, P., Keil, F., Prinz, E., Moser, K., Schulenburg, A., Mitterbauer, M., Mannhalter, C., Mayr, W. R., Schwarzingger, I., Hocker, P., Lechner, K. & Greinix, H. T. 2003. ABO mismatch increases transplant-related morbidity and mortality in patients given nonmyeloablative allogeneic HPC transplantation. *Transfusion*, 43, 1153-61.

7 Anhang

Der Anhang enthält die statistische und graphische Gegenüberstellung transplantatspezifischer Kenngrößen wie das Alter, das Knochenmarkvolumen, den Stammzellgehalt, die Stammzellrecovery sowie Daten zum Engraftment als Box-Whisker-Plots für die verschiedenen Gruppen.

7.1 Abb. 1: Altersverteilung der Empfänger in den Gruppen

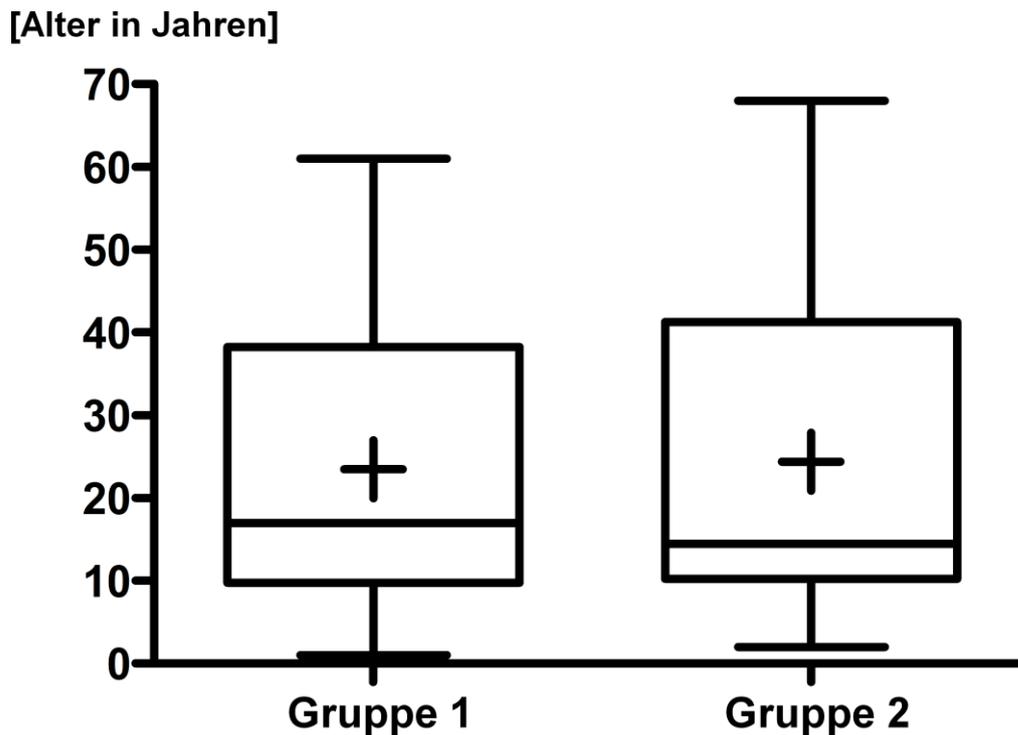


Abbildung 1: Altersverteilung der Empfänger. **Gruppe 1** (n=38): unverarbeitet transplantiertes Knochenmarkprodukt, Median: 17 Jahre, Minimum: 1 Jahr, Maximum: 62 Jahre. **Gruppe 2** (n=34): verarbeitetes Knochenmarkprodukt, Median: 14,5 Jahre, Minimum: 2 Jahre, Maximum: 68 Jahre

7.2 Abb. 2: Knochenmarkvolumina vor weiterer Verarbeitung

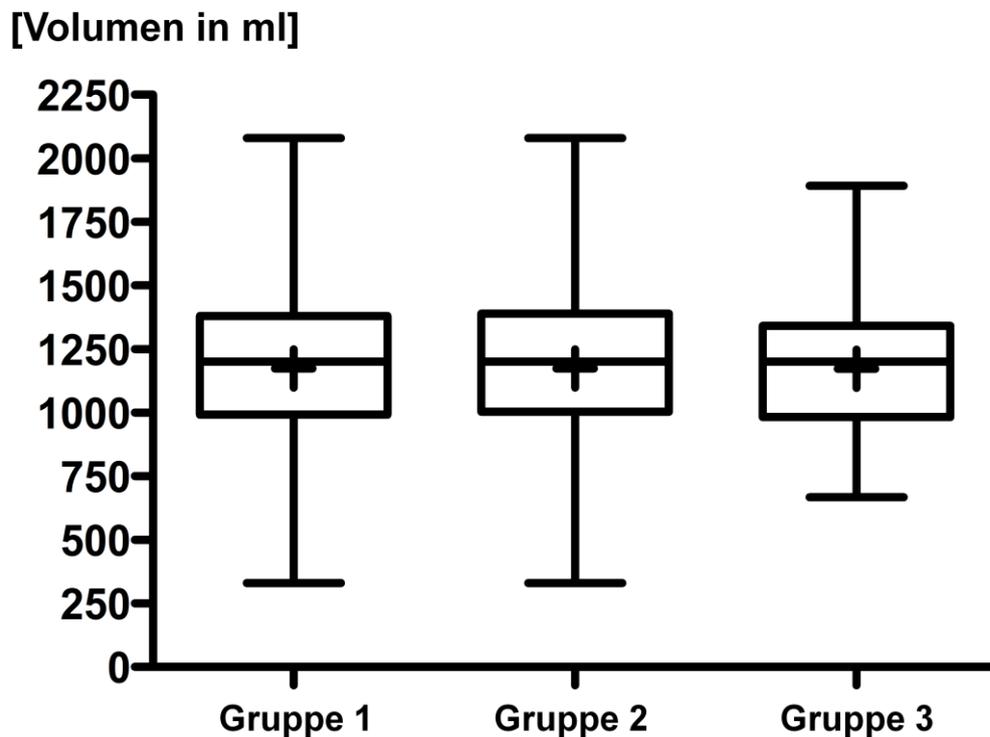


Abbildung 2: Knochenmarkvolumina vor weiterer Verarbeitung. **Gruppe 1** (n=71): Knochenmarkvolumen aller Produkte, Median: 1.200 ml, Minimum: 330 ml, Maximum: 2.080 ml. **Gruppe 2** (n=38): Knochenmarkprodukte, die keiner Weiterverarbeitung unterzogen wurden, Median: 1.200 ml, Minimum: 330 ml, Maximum: 2.080 ml. **Gruppe 3** (n=33) Knochenmarkprodukte vor weiterer Verarbeitung, Median: 1.200 ml, Minimum: 669 ml, Maximum: 1.892 ml

7.3 Abb. 3: Knochenmarkvolumina vor/nach Verarbeitung

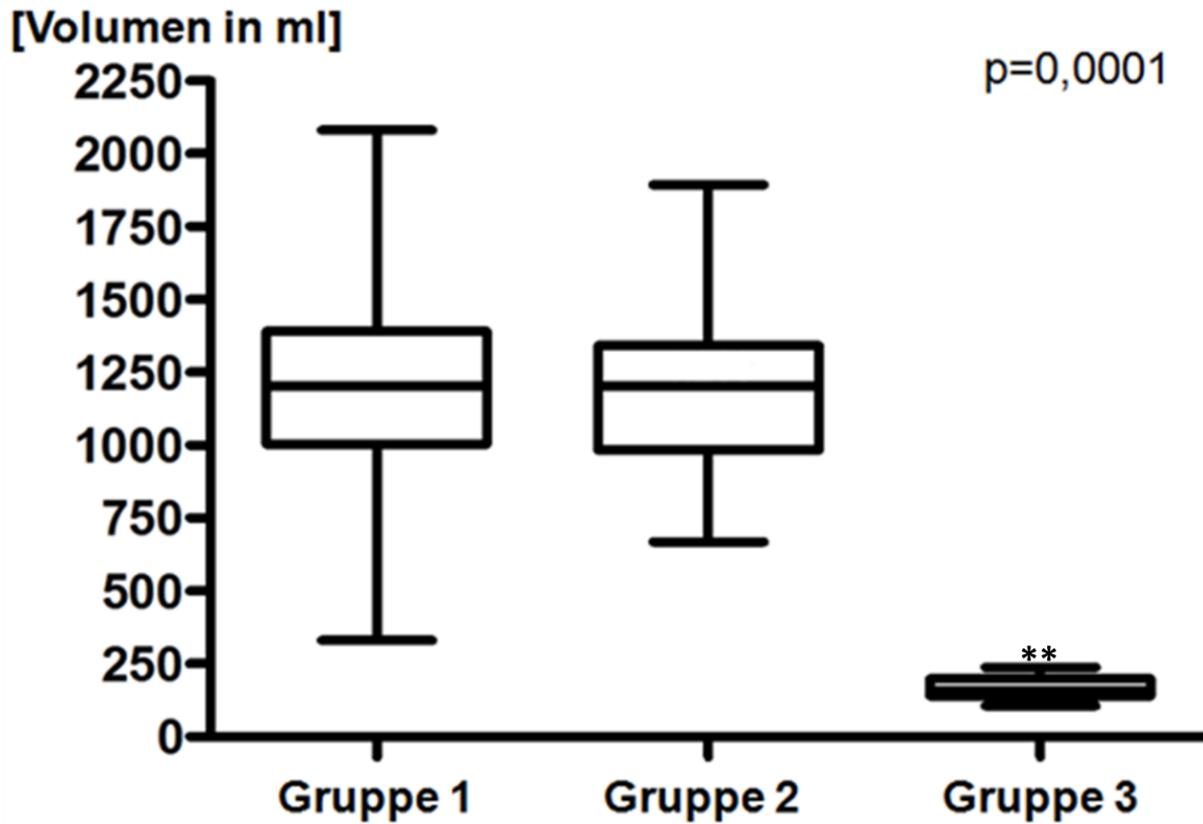


Abbildung 3: Knochenmarkvolumina vor und nach der Verarbeitung. **Gruppe 1** (n=38): Knochenmarkprodukte, die keiner Weiterverarbeitung unterzogen wurden, Median: 1.200 ml, Minimum: 330 ml, Maximum: 2.080 ml. **Gruppe 2** (n=33): Knochenmarkprodukte vor der Verarbeitung, Median: 1.200 ml, Minimum: 669 ml, Maximum: 1.892 ml. **Gruppe 3** (n=34): Knochenmarkprodukte nach der Verarbeitung, Median: 159 ml, Minimum: 105 ml, Maximum: 238 ml. ** statistisch signifikant (p=0,0001)

7.4 Abb. 4: Wirkstoffgehalt CD 34-positiver Zellen vor/nach Verarbeitung

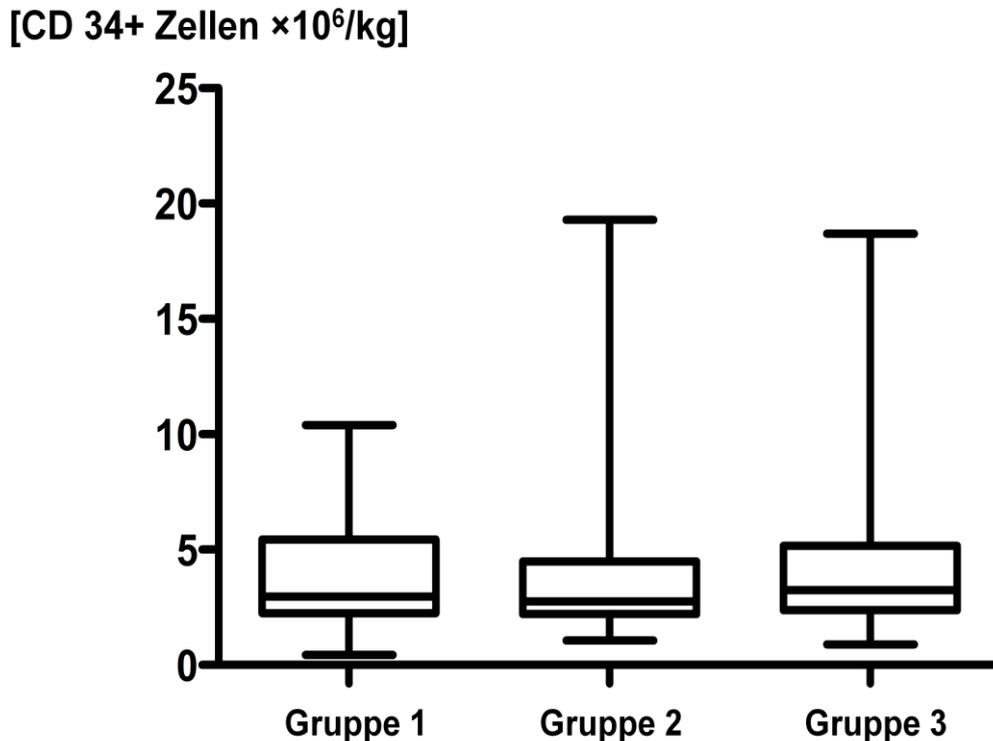


Abbildung 4: Wirkstoffgehalt CD34-positiver Zellen $\times 10^6/\text{kg}$ KG vor und nach Verarbeitung: **Gruppe 1** (n=27): Knochenmarkprodukte, die keiner Weiterverarbeitung unterzogen wurden, Median: $2,97 \times 10^6$ CD34-positive Zellen, Minimum: $0,45 \times 10^6$ CD34-positive Zellen, Maximum: $10,4 \times 10^6$ CD34-positive Zellen. **Gruppe 2** (n=32): Knochenmarkprodukte vor der Verarbeitung, Median: $2,76 \times 10^6$ CD34-positive Zellen, Minimum: $1,07 \times 10^6$ CD34-positive Zellen, Maximum: $19,31 \times 10^6$ CD34-positive Zellen. **Gruppe 3** (n=34): Knochenmarkprodukte nach der Verarbeitung, Median: $3,25 \times 10^6$ CD34-positive Zellen, Minimum: $0,9 \times 10^6$ CD34-positive Zellen, Maximum: $18,7 \times 10^6$ CD34-positive Zellen

7.5 Abb. 5: Wirkstoffgehalt NC vor/nach Verarbeitung

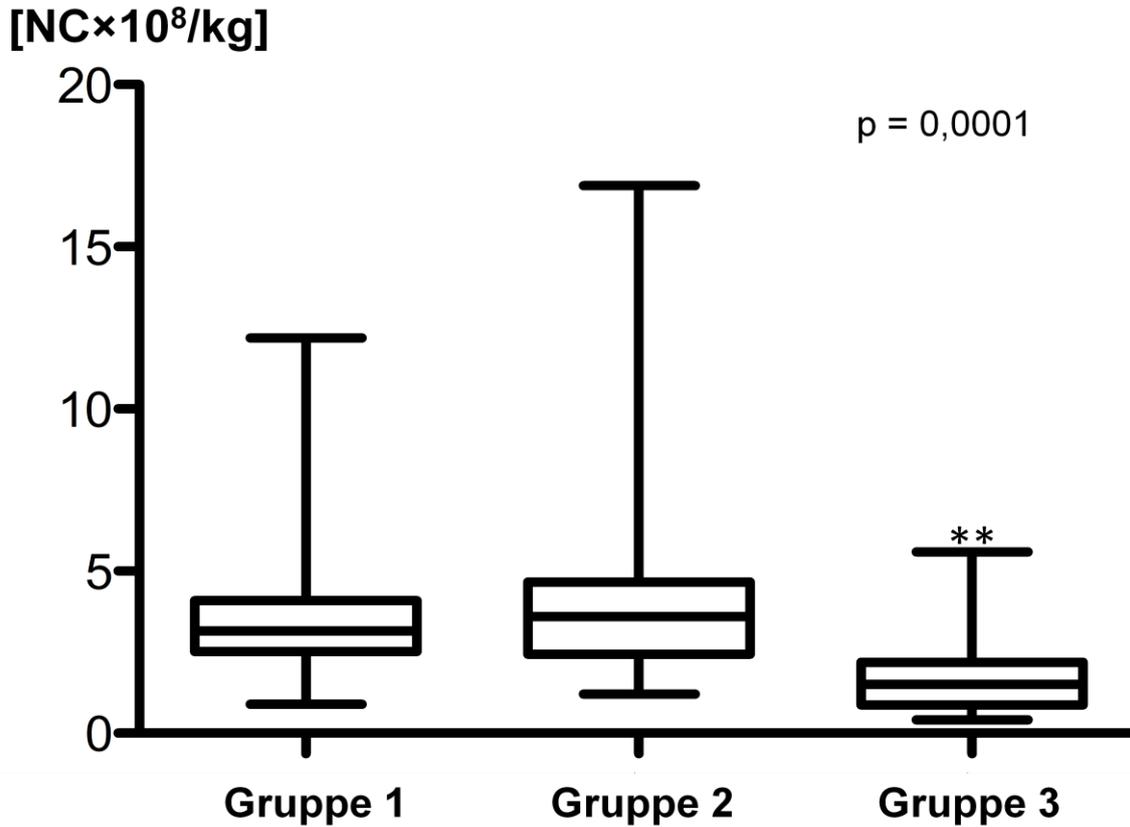


Abbildung 5: Wirkstoffgehalt der NC vor und nach Verarbeitung. **Gruppe 1** (n=36): Knochenmarkprodukte, die keiner Weiterverarbeitung unterzogen wurden, Median: $3,15 \times 10^8 / \text{kg KG}$, Minimum: $0,9 \times 10^8 / \text{kg KG}$, Maximum: $12,2 \times 10^8 / \text{kg KG}$. **Gruppe 2** (n=33): Knochenmarkprodukte vor der Verarbeitung, Median: $3,6 \times 10^8 / \text{kg KG}$, Minimum: $1,2 \times 10^8 / \text{kg KG}$, Maximum: $16,9 \times 10^8 / \text{kg KG}$. **Gruppe 3** (n=34): Knochenmarkprodukte nach der Verarbeitung, Median: $1,5 \times 10^8 / \text{kg KG}$, Minimum: $0,4 \times 10^8 / \text{kg KG}$, Maximum: $5,6 \times 10^8 / \text{kg KG}$. ** statistisch signifikant

7.6 Abb. 6: Daten zur Recovery der verschiedenen Wirkstoffe

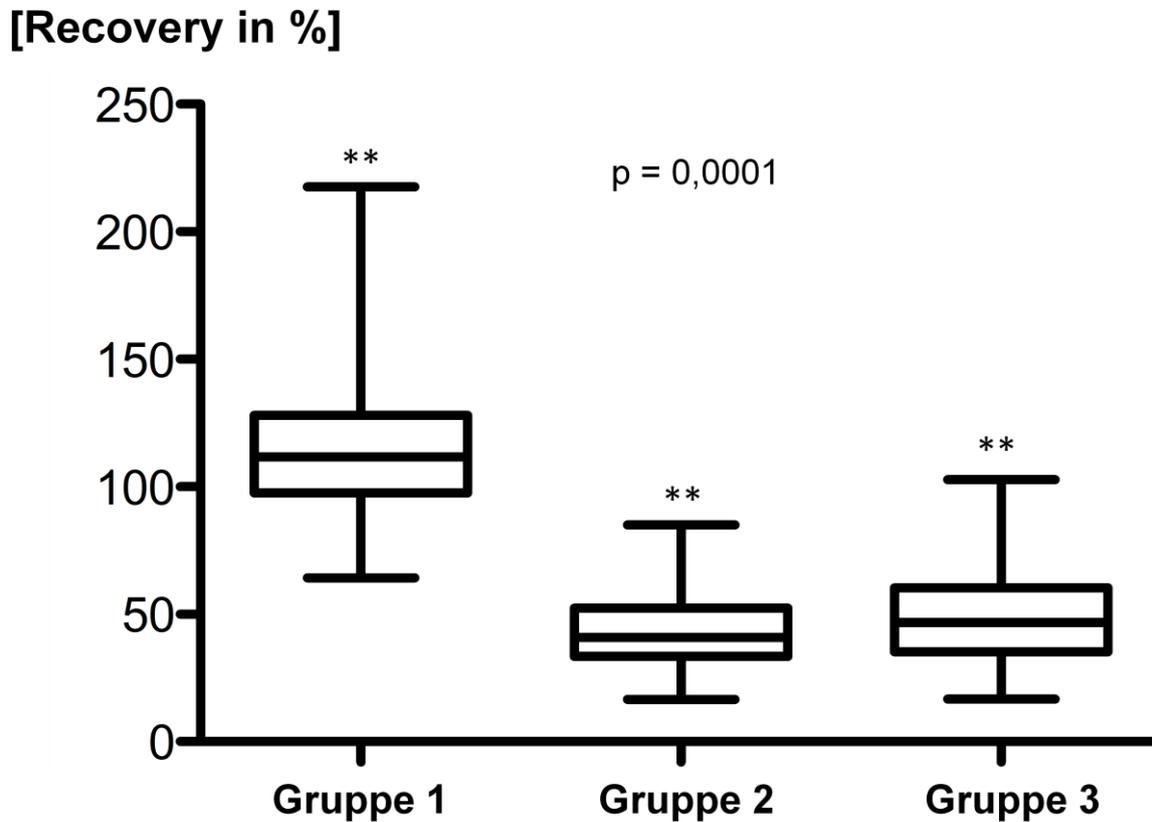


Abbildung 6: Daten zur Recovery der verschiedenen Wirkstoffe im Transplantat **Gruppe 1** (n=32): Recovery der CD34-positiven Zellen, Median 111,7%, Minimum: 64,2%, Maximum 217,6 %. **Gruppe 2** (n=33): Recovery der NC, Median: 41%, Minimum: 16,5%, Maximum 85,1%. **Gruppe 3** (n=32): Recovery der CD45-positiven Zellen, Median: 46,8 %, Minimum: 16,8%, Maximum: 102,7%. ** statistisch signifikant

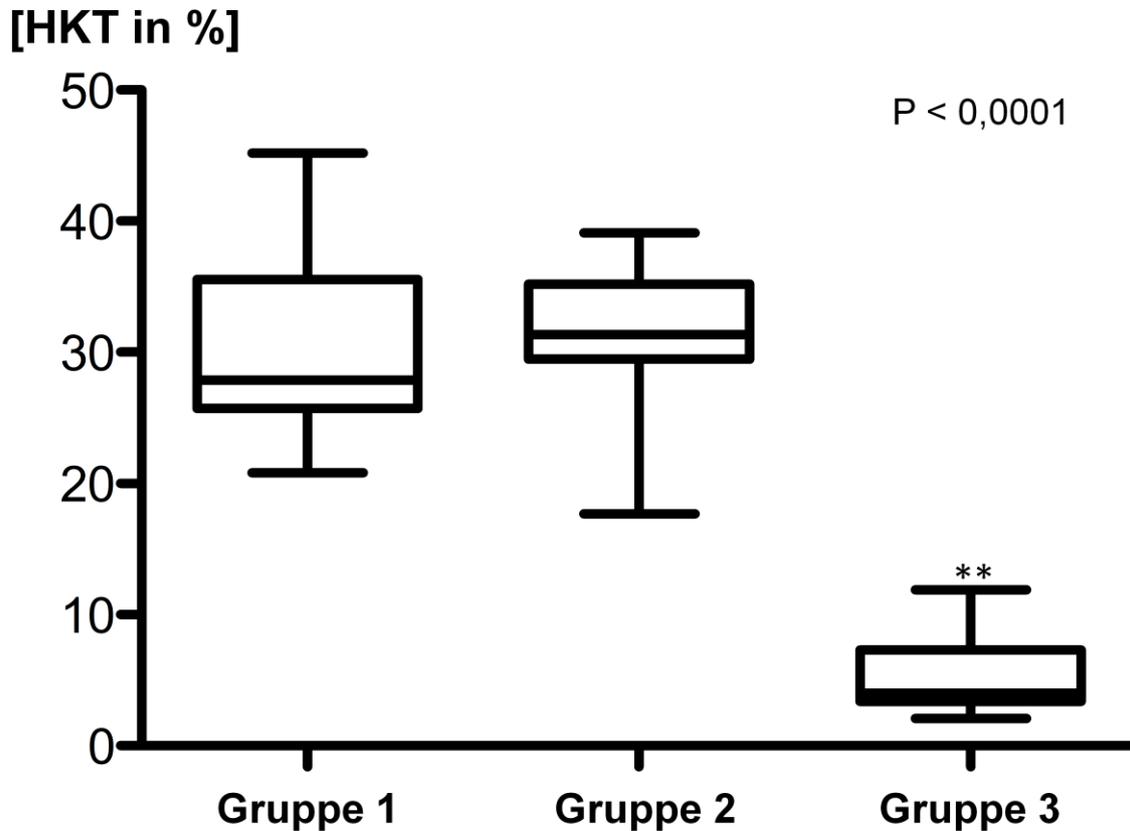
7.7 Abb. 7: Daten zum Hämatokrit (HKT) in den Produkten

Abbildung 7: Daten zum Hämatokrit in den Knochenmarkprodukten. **Gruppe 1** (n=16): Knochenmarkprodukte, die keiner Weiterverarbeitung unterzogen wurden, Median: 27,9%, Minimum: 20,8%, Maximum: 45,2%. **Gruppe 2** (n=32): Knochenmarkprodukte vor der Verarbeitung, Median: 31,4%, Minimum: 17,7%, Maximum: 39,1%. **Gruppe 3** (n=33): Knochenmarkprodukte nach Verarbeitung, Median: 4%, Minimum: 2,1%, Maximum: 11,9%

7.8 Abb. 8: Daten zum Erythrozytenvolumen in den Knochenmarkprodukten

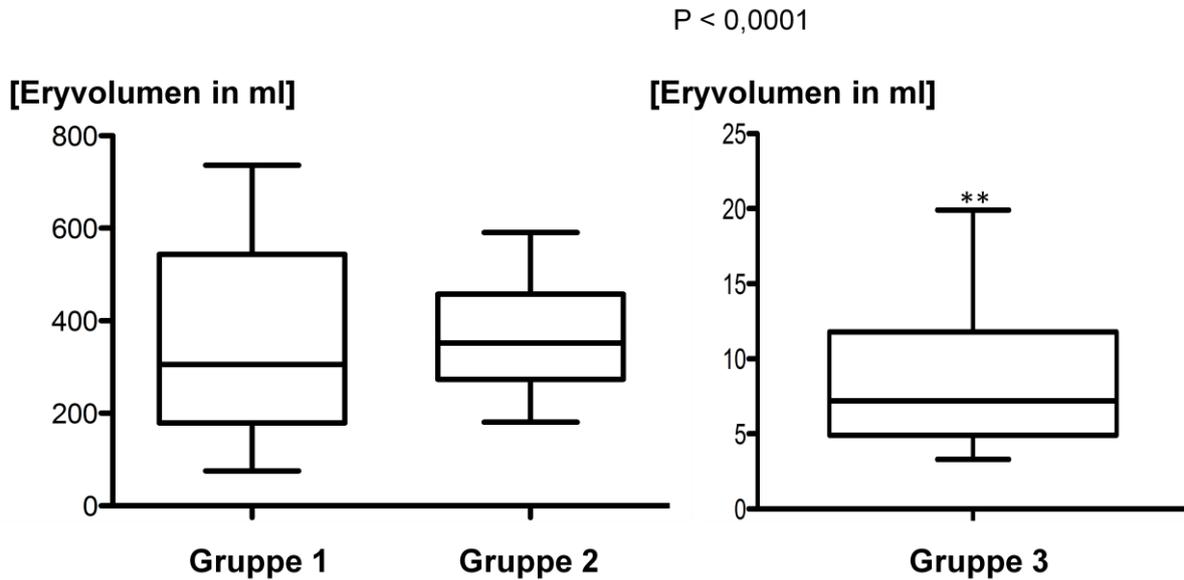


Abbildung 8: Daten zum Erythrozytenvolumen in den Knochenmarkprodukten. **Gruppe 1** (n=19): Knochenmarkprodukte, die keiner Weiterverarbeitung unterzogen wurden, Median: 306 ml, Minimum: 126,3 ml, Maximum: 736,3 ml. **Gruppe 2** (n=31): Knochenmarkprodukte vor der Verarbeitung, Median: 352,3 ml, Minimum: 181 ml, Maximum: 591,2 ml. **Gruppe 3** (n=28): Knochenmarkprodukte nach der Verarbeitung, Median: 7,2 ml, Minimum: 3,3 ml, Maximum: 19,9 ml. ** statistisch signifikant

7.9 Abb. 9.1 und 9.2: Daten zum Erythrozytenvolumen/kg und der Erythrozyteneffizienz nach erfolgter Verarbeitung

[Eryvolumen in ml/kg]

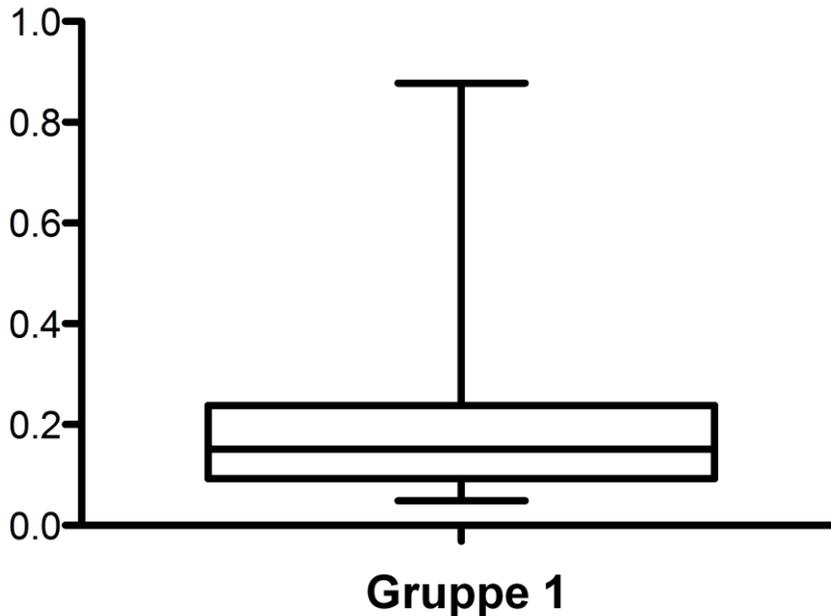


Abbildung 9.1: Gruppe 1: Daten zum Erythrozytenvolumen/kg KG nach durchgeführter Erythrozytendepletion (n=28): Median: 0,15 ml/kg KG, Minimum: 0,049 ml/kg KG, Maximum: 0,88 ml/kg KG

[Erydepletionseffizienz in %]

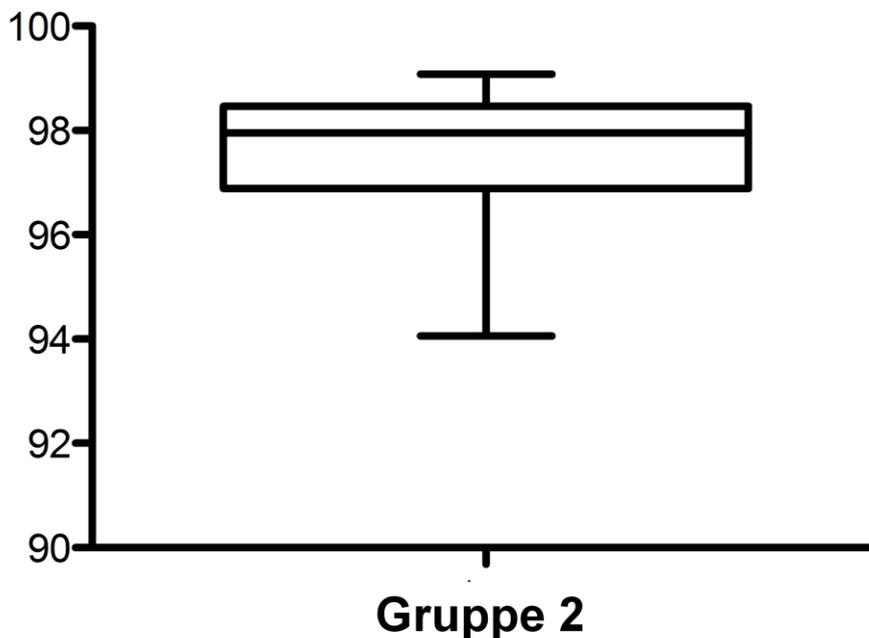


Abbildung 9.2: Gruppe 2: Daten zur Erythrozytendepletionseffizienz durch die Verarbeitung in % (n=28): Median: 97,95%, Minimum: 94,05%, Maximum: 99,07%.

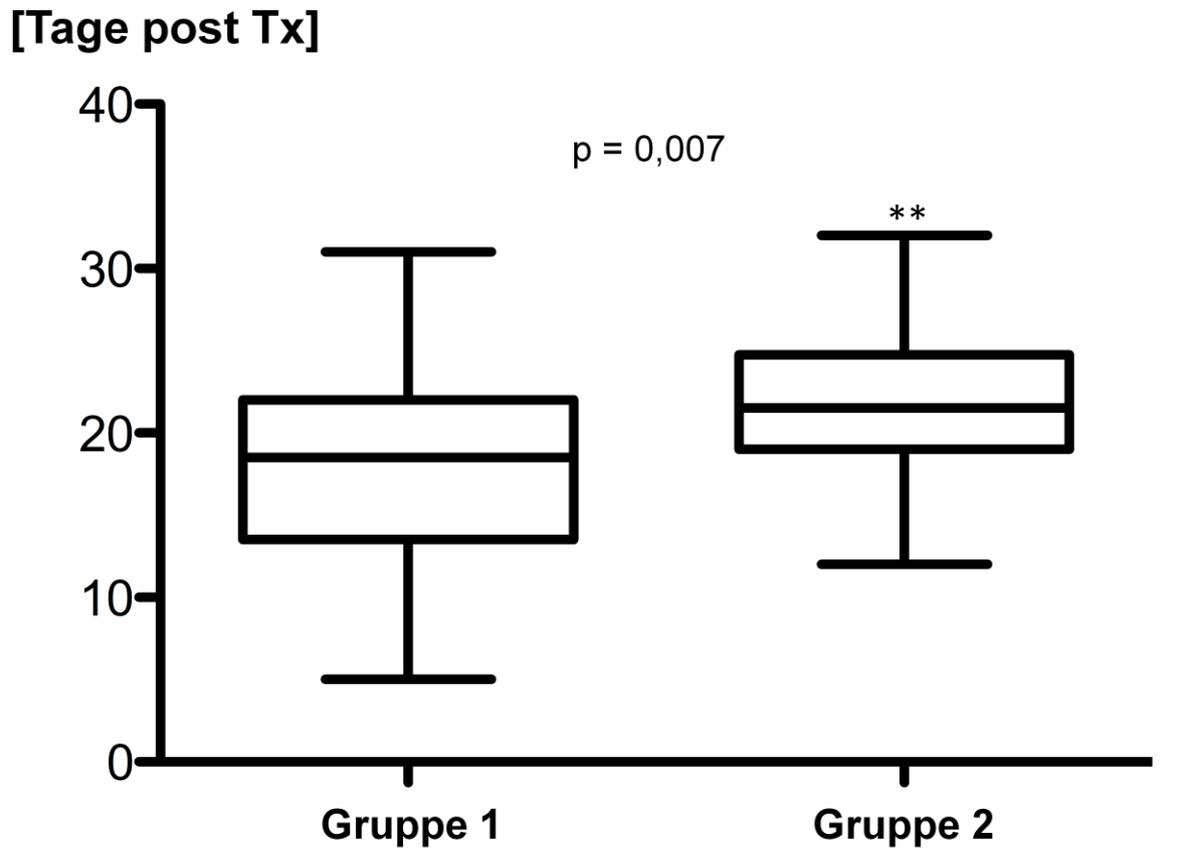
7.10 Abb. 10: Daten zum Engraftment (Leukozyten > 1000, an 3 Tagen)

Abbildung 10: Daten zum Leukozytenengraftment nach Knochenmarktransplantation. **Gruppe 1** (n=32): Transplantationen mit unmanipuliertem Knochenmark, Median: 18,5 Tage, Minimum: 5 Tage, Maximum: 31 Tage. **Gruppe 2** (n=28): Transplantationen mit erythrozytendepletiertem Knochenmark, Median: 21,5 Tage, Minimum: 12 Tage, Maximum: 32 Tage. ** statistisch signifikant

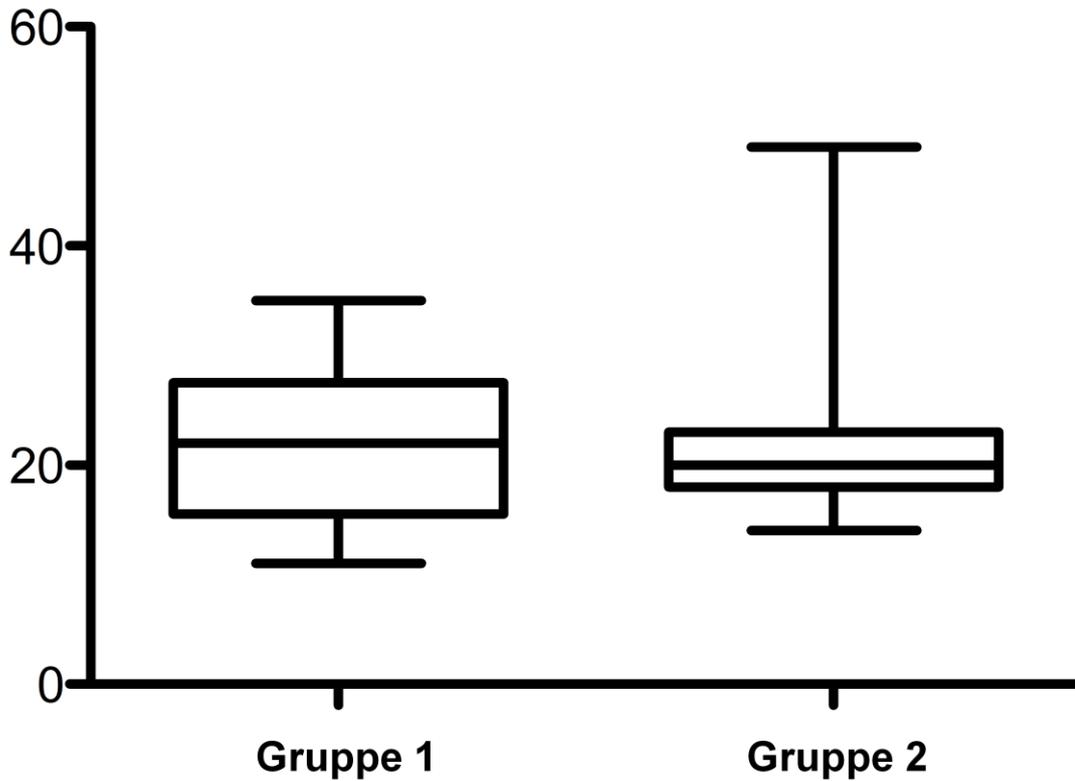
7.11 Abb. 11: Daten zum Engraftment (Thrombozyten > 20/nl)**[Tage post Tx]**

Abbildung 11: Daten zum Thrombozytenengraftment. **Gruppe 1** (n=18): Transplantationen mit unverarbeitetem Knochenmark, Median: 22 Tage, Minimum: 11 Tage, Maximum: 35 Tage. **Gruppe 2** (n=19): Transplantationen mit erythrozytendepletiertem Knochenmark, Median: 20 Tage, Minimum: 14 Tage, Maximum: 49 Tage.

Danksagung

Für das Entstehen dieser Arbeit ist nicht nur eine Person allein verantwortlich. Um meinen Traum vom Dokortitel zu verwirklichen, bedurfte ich der Hilfe vieler fantastischer, kreativer und geduldiger Mitmenschen. An dieser Stelle möchte ich mich daher herzlich bei allen bedanken, die mich beim Erstellen meiner Dissertation bis zuletzt tatkräftig unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Martin Gramatzki, Direktor der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie im Dr. Mildred-Scheel-Haus des Universitätsklinikums Schleswig Holstein, Campus Kiel, möchte ich für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Dissertation in der von ihm geleiteten Klinik danken.

Mein größter Dank gebührt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Andreas Humpe, für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas sowie seine unermüdliche Unterstützung, den Ansporn und die wertvoll konstruktive Kritik zu allen Zeitpunkten.

Weiterhin danke ich den MTAs des GMP-Labors, die mir mit bestärkenden Pausengesprächen eine familiäre und angenehme Arbeitsatmosphäre schufen.

Ein herzliches Dankeschön geht darüber hinaus an meinen Freund Mirko, der mir geduldig in allen gestaltungstechnischen Belangen dieser Arbeit zur Seite stand und mit dem ich durch alle Höhen und Tiefen unseres Medizinstudiums gehen konnte.

Von Herzen danke ich auch Christine Gerle und Almut Langenfeld, passionierte Lehrerinnen a.D., die sich en détail mit der Grammatik dieser Dissertation auseinandersetzen.

Mein innigster Dank gilt meiner wundervollen Mama, die mich immer ermutigt und an mich geglaubt hat. Ihre emotionale und intellektuelle Unterstützung hat mich bis heute geprägt.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Schill
 Vorname: Sarah
 Geburtsdatum: 06.05.1988
 Geburtsort: Eberswalde- Finow
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit; Deutsch

Schullaufbahn

1994 - 2000 Grundschule „Zum Schwärzensee“ Eberswalde
 2000 - 2007 Gymnasium Finow
 06/2007 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

10/2007 Beginn des Studiums der Humanmedizin
 an der Christian Albrechts Universität zu Kiel
 09/2009 1. Staatsexamen (Physikum)
 08/2012 – 07/2013 Praktisches Jahr
 08/2012 – 12/2012 1. Tertial: Augenheilkunde Klinik für Ophthalmologie Uni Kiel
 12/2012 – 02/2013 2. Tertial: Chirurgie 1. Teil Westküstenklinikum Heide
 02/2013 – 04/2013 2. Teil Cebu Doctors University
 Philippinen
 04/2013 – 07/2013 3. Tertial: Innere Medizin an den Segeberger Kliniken
 11/2013 2. Staatsexamen

Berufstätigkeit

seit 01/2014 - dato Assistenzärztin in der Klinik für Augenheilkunde
 am Klinikum Barnim „Werner-Forßmann-Krankenhaus“

Dissertation

seit 02/2011 *Knochenmarkstammzelltransplantate: Retrospektiver Vergleich
 qualitätsbestimmender Parameter zwischen unmanipulierten
 und erythrozytendepletierten Produkten aufgrund ABO-
 Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger-
 II. Medizinische Klinik, Sektion für Stammzell- und
 Immuntherapie, Dr. Mildred Scheel Haus,
 (Direktor: Prof. Dr. Martin Gramatzki),
 am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
 Doktorvater: Prof. Dr. Andreas Humpe*