

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie  
Campus Virchow-Klinikum  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Huhn  
Medizinische Fakultät Charité der  
Humboldt-Universität zu Berlin

**Periphere Blutstammzellen:  
Mobilisation, Separation und hämatopoetische Rekonstitution  
nach Hochdosischemotherapie bei Patienten mit Keimzelltumoren**

Der Medizinischen Fakultät  
Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin  
als Habilitationsschrift  
zur Erlangung der *venia legendi*  
vorgelegt

von  
Dr. med. Nimrod Schwella



Berlin 1999

Gutachter:

Prof. Dr. med. H. J. Kolb, München

Prof. Dr. med. B. Kubanek, Ulm

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag vor der Medizinischen Fakultät:

2 Mai 2000

## Inhaltsverzeichnis

### 1. Einleitung

1.1.	Hochdosischemotherapie und Transplantation hämatopoetischer Stammzellen	2
1.2.	Zirkulierende hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen	2
1.3.	Das CD34 Antigen	4
1.4.	Mobilisation autologer Blutstammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut	4
1.4.1.	Mobilisation durch zytostatische Medikamente	4
1.4.2.	Mobilisation durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren	5
1.4.3.	Mobilisation durch Chemotherapie und Wachstumsfaktoren	6
1.5.	"Monitoring" der zirkulierenden Blutstammzellen nach Mobilisation	6
1.6.	Rekonstitution der Blutbildung nach Hochdosistherapie und Transplantation von autologen hämatopoetischen Stammzellen	7
1.6.1.	Hämatopoetische Regeneration nach autologer Knochenmarkstransplantation	7
1.6.2.	Hämatopoetische Regeneration nach Transplantation von autologen peripheren Blutstammzellen	8
1.7.	Hochdosischemotherapie und Transplantation autologer Blutstammzellen bei Patienten mit malignen Keimzelltumoren	8

### 2. Patienten und Methoden

2.1.	Patientenkollektiv	10
2.2.	Mobilisierungschemotherapie	10
2.2.1.	Cisplatin, Etoposid und Ifosfamid (PEI)	11
2.2.2.	Taxol, Ifosfamid und Cisplatin (TIP)	11
2.2.3.	Taxol und Ifosfamid (TI)	12
2.3.	Bestimmung zirkulierender Blutstammzellen	13
2.4.	Separation zirkulierender Blutstammzellen	13
2.5.	Kryokonservierung und Lagerung peripherer Blutstammzellen	13

2.6.	Laboratoriumsuntersuchungen zur Qualitätskontrolle der Stammzellprodukte	14
2.6.1.	Untersuchungen vor Kryokonservierung	14
2.6.2.	Untersuchungen nach Kryokonservierung	14
2.7.	Hochdosismchemotherapie	16
2.7.1.	Carboplatin, Etoposid und Ifosfamid (CEI)	16
2.7.2.	Carboplatin, Etoposid und Thiotepa (CET)	16
2.8.	Auftauen und Reinjektion autologer Blutstammzellen	17
2.9.	Anwachsen des Transplantats ("Engraftment")	19
2.10.	Supportivtherapie	19
2.11.	Dokumentation und statistische Analysen	20
2.11.1.	Korrelationsanalysen	20
2.11.2.	Analysen zur Mobilisation und Separation peripherer Blutstammzellen	20
2.11.3.	Analysen zur hämatopoetischen Regeneration nach Hochdosistherapie	20
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	
3.1.	Patienten	23
3.1.1.	Zytostatische Vorbehandlung	25
3.1.2.	Mobilisation und Separation peripherer Blutstammzellen	25
3.1.3.	Mobilisationschemotherapie und Leukozytenkinetik	28
3.1.3.1.	Mobilisation durch PEI und Verlauf der Leukozyten	28
3.1.3.2.	Mobilisation durch TIP und Verlauf der Leukozyten	29
3.1.3.3.	Mobilisation durch TI und Verlauf der Leukozyten	30
3.1.4.	Einleitung der Leukapheresen	31
3.1.5.	Ergebnisse der Leukapheresen	31
3.1.6.	Univariate Analyse prädiktiver Faktoren für die Mobilisation und Separation von CD34+ Zellen	33
3.1.6.1.	Alter der Patienten	33
3.1.6.2.	Zytostatische Vorbehandlung	33
3.1.6.3.	Kumulative Cisplatin-Dosis	34
3.1.6.4.	Kumulative Etoposid-Dosis	36
3.1.6.5.	Kumulative Ifosfamid-Dosis	37
3.1.6.6.	Mobilisationschemotherapie	38

3.1.7.	Andere Parameter	41
3.1.8.	Multivariate Analyse prädiktiver Faktoren für die Mobilisation und Separation von CD34+ Zellen	41
3.1.9.	Korrelationsanalyse zur Definition prädiktiver Parameter des Blutbilds für zirkulierende CD34+ Zellen und gesammelte CFU-GM und CD34+ Zellen	44
3.1.9.1.	Zirkulierende CD34+ Zellen	44
3.1.9.2.	Separation von CFU-GM	45
3.1.9.3.	Separation von CD34+ Zellen	45
3.1.10.	Hochdosischemotherapie und Transplantation autologer Blutstammzellen	53
3.1.10.1.	Transplantierte Zelldosis	54
3.1.10.2.	Hämatopoetische Rekonstitution	55
3.1.10.2.1.	Gesamtkollektiv	55
3.1.10.2.2.	Patienten mit PEI-Mobilisation und Hochdosis-CEI	56
3.1.10.2.3.	Patienten mit TIP-Mobilisation und Hochdosis-CET	58
3.1.10.2.4.	Patienten mit TI-Mobilisation und Hochdosis-CET	58
3.1.10.2.5.	Vergleich der Hämatopoese nach Transplantation einer Zelldosis $\geq 2,5 \times 10^6$ oder $< 2,5 \times 10^6$ CD34+ Zellen/kg	61
3.1.10.2.6.	Univariate Analyse (log rank Test) prädiktiver Faktoren für die hämatopoetische Rekonstitution nach Hochdosischemotherapie	63
3.1.10.2.6.1.	CD34+ Zellen und Regeneration der Granulozyten	64
3.1.10.2.6.2.	CFU-GM und Regeneration der Granulozyten	67
3.1.10.2.6.3.	CD34+ Zellen und Regeneration der Thrombozyten	68
3.1.10.2.6.4.	CFU-GM und Regeneration der Thrombozyten	71
3.1.10.2.6.5.	Andere Parameter	72
3.1.10.2.7.	Multivariate Analyse (Cox Regression) prädiktiver Faktoren für die hämatopoetische Rekonstitution nach Hochdosischemotherapie	73
3.1.10.2.7.1.	Rekonstitution der Granulozyten	73
3.1.10.2.7.2.	Rekonstitution der Thrombozyten	74
3.1.10.3.	Supportivtherapie nach Hochdosischemotherapie und Transplantation autologer Blutstammzellen	75
3.1.10.3.1.	Gesamtkollektiv und einzelne Patientengruppen	75

3.1.10.3.2.	Rolle der Dosis transplantiertes CD34+ Zellen	76
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1.	Mobilisation und Separation peripherer Blutstammzellen	81
4.2.	Prädiktive Parameter für die Mobilisation und Separation von CD34+ Zellen	84
4.3.	Prädiktive Faktoren für den Ertrag der Leukapherese	87
4.4.	Hämatopoetische Rekonstitution nach Hochdosischemotherapie	91
4.5.	Prädiktive Faktoren für die hämatopoetische Rekonstitution nach Hochdosischemotherapie	93
4.6.	Supportivtherapie nach Hochdosischemotherapie und Transplantation autologer Blutstammzellen	96
4.7.	Schlußfolgerung	98
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	99
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	101
<b>7.</b>	<b>Danksagung</b>	126

## Abkürzungen

AFP	Alpha-Fetoprotein
BFU-E	Burst-forming units erythrocyte
CD34	Oberflächenmarker auf hämatopoetischen Stammzellen
CEI	Carboplatin, Etoposid, Ifosfamid
CET	Carboplatin, Etoposid, Thiotepa
CFU-GM	Colony-forming units granulocyte-macrophage
CML	Chronische myeloische Leukämie
CPM	Cyclophosphamid
CR	Komplette Remission
D	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HCG	Humanes Chorion Gonadotropin
HDCT	Hochdosischemotherapie
MNC	Mononukleäre Zellen
NE	Nicht evaluiert
NS	Nicht signifikant
PBSZ	Periphere Blutstammzellen
PEI	Cisplatin, Etoposid, Ifosfamid
PD	Progrediente Erkrankung ("progressive disease")
PR	Partielle Remission
PR-	Partielle Remission (tumormarker negativ)
PR+	Partielle Remission (tumormarker positiv)
SD	Stabile Erkrankung ("stable disease")
TI	Taxol, Ifosfamid
TIP	Taxol, Ifosfamid, Cisplatin

## Abstrakt

Bei Patienten mit Keimzelltumoren werden Mobilisation und Separation peripherer Blutstammzellen durch das Alter, die zytostatische Vorbehandlung und Art der Mobilisationschemotherapie statistisch signifikant beeinflusst. Der beste prädiktive Parameter für die gesammelten Stamm- und Vorläuferzellen ist die Anzahl der peripheren CD34+ Zellen, die am Tag der Leukapherese im Blutkreislauf zirkulieren. Für die Rekonstitution der Granulo- und Thrombozytopoese nach Hochdosischemotherapie ist die Dosis der transfundierten CD34+ Zellen von signifikantem Wert. Bei der Transplantation von mehr als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg kann mit einer schnellen und sicheren Regeneration der Hämatopoese, einem niedrigeren Bedarf an Antibiotika, Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten sowie einem kürzeren Krankenhausaufenthalt gerechnet werden.

**Schlüsselwörter:** Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen – Mobilisation und Separation – Hochdosischemotherapie – Autologe Transplantation

## Abstract

In patients with germ cell cancer the mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells are significantly influenced by patient's age, cytotoxic pretreatment and the mobilization chemotherapy used. The best predictive factor for harvested progenitor cells is the number of CD34+ cells circulating in the peripheral blood on the day of leukapheresis. The dose of transfused CD34+ cells has a significant impact on the reconstitution of granulocytes and platelets after high-dose chemotherapy. Transplantation of more than  $2,5 \times 10^6$  CD34+ cells/kg results in a rapid and safe regeneration of hematopoiesis, less antibiotics and transfusion requirements (red blood cell and platelet concentrates) and a shorter hospital stay.

**Key Words:** hematopoietic stem and progenitor cells – mobilization and collection – high-dose chemotherapy – autologous transplantation

## **1. Einleitung**

### **1.1. Hochdosischemotherapie und Transplantation hämatopoetischer Stammzellen**

Hochdosistherapiestrategien gewinnen in letzter Zeit in der Behandlung von hämatologischen Malignomen und soliden Tumoren zunehmend an Bedeutung (1, 2). Hierbei kommt eine Hochdosischemo-/Radiotherapie zur Anwendung, die jedoch wegen der ausgeprägten Hämatotoxizität (Myelosuppression) für den Patienten potentiell gefährlich ist. Um die Rekonstitution der eigenen Hämatopoese zu gewährleisten und zu beschleunigen, werden dem Patienten im Anschluß an die Hochdosistherapie autologe hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks oder des peripheren Blutes als "Transplantat" verabreicht (3-6). Bis Ende der achtziger Jahre kamen überwiegend hämatopoetische Transplantate des Knochenmarks zur Anwendung. Seit einigen Jahren sind jedoch die hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen des peripheren Blutes, die mittels Leukapherese am Zellseparator gewonnen werden, in den Mittelpunkt der autologen Transplantation gerückt. Verglichen mit Knochenmarkstransplantaten bieten periphere Blutstammzellen einige Vorteile: es wird keine Vollnarkose zur Entnahme benötigt, die Gewinnung ist auch bei Patienten mit Knochenmarkfibrose oder krankheitsbedingtem Knochenmarkbefall möglich und sie führen zu einer schnelleren hämatopoetischen Rekonstitution nach Hochdosischemo-/Radiotherapie (7-10). Ob autologe Transplantate des peripheren Blutes eine seltenere Kontamination durch maligne Zellen aufweisen, ist derzeit Gegenstand kontroverser Diskussion (11-14).

### **1.2. Zirkulierende hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen**

In der ersten Hälfte der sechziger Jahre konnte im Maus- und Hundemodell erstmals die Existenz von zirkulierenden hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen werden (15-17). Anfang der siebziger Jahre fanden McCredie et al und andere Arbeitsgruppen im

menschlichen Blut zirkulierende mononukleäre Zellen (MNC), die die Fähigkeit besaßen auf Methylzellulose in-vitro granulozytäre und monozytäre Zellkolonien der Hämatopoese zu bilden (CFU-GM: colony-forming units granulocyte-macrophage) (18-21). Einige Jahre später konnten mehrere Arbeitsgruppen am Hundemodell zeigen, daß durch die Übertragung von MNC des peripheren Blutes die Hämatopoese von Hunden, die zuvor eine myeloablative Therapie mit Cyclophosphamid (CPM) und Busulfan oder eine letale Ganzkörperbestrahlung erhalten hatten, wiederhergestellt werden konnte (22-26). Basierend auf Erkenntnissen am Hundemodell versuchten einige Forschergruppen zirkulierende MNC mittels Leukapherese am Zellseparator aus dem Blutkreislauf des Menschen zu gewinnen (27-30). Ende der siebziger Jahre gelang Goldman et al der Nachweis, daß zirkulierende MNC die menschliche Hämatopoese in-vivo rekonstituieren können. Patienten in fortgeschrittenen Stadien einer chronischen myeloischen Leukämie (CML) erhielten eine myeloablative Therapie gefolgt von der Reinfusion autologer MNC, die zuvor während der chronischen Krankheitsphase oder nach einer zytostatischen Therapie mit CPM gesammelt und kryokonserviert worden waren (31). Die Myelosuppression der Patienten wurde erfolgreich überwunden, die erzielte chronische Phase der CML war jedoch von kurzer Dauer (32). Es folgten weitere sporadische Mitteilungen über Transplantation von zirkulierenden hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, die jedoch erfolglos verliefen (33-35). Systematische Untersuchungen zur Gewinnung und Transplantation peripherer Blutstammzellen wurden erst ab Mitte der achtziger Jahre durchgeführt (36-40). Besonderes Interesse galt zunächst Patienten, deren Knochenmark aufgrund einer vorausgehenden Strahlentherapie fibrotisch oder mit malignen Zellen der Grunderkrankung infiltriert war (41, 42). Es zeigte sich jedoch, daß die Reinfusion von zirkulierenden Blutstammzellen, die im sogenannten "steady state", das heißt unter Ruhebedingungen, gewonnen wurden, mit dem Risiko einer verzögerten hämatopoetischen Regeneration nach Hochdosistherapie behaftet war, die vor allem die Thrombopoese betraf (43). Desweiteren waren teilweise mehr als zehn Sitzungen (Leukapheresen) am Zellseparator nötig, um eine ausreichende Dosis an MNC zu gewinnen (44). Die Erkenntnisse über die Mobilisation von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut im Anschluß an eine zytostatische Chemotherapie und/oder nach Verabreichung eines hämatopoetischen Wachstumsfaktors hatten wegweisende Bedeutung für die Separation und Transplantation

peripherer Blutstammzellen (45-47). In der Folgezeit gelang es die Zahl der Leukapheresen, die zur Gewinnung eines suffizienten hämatopoetischen Transplantats nötig war, drastisch zu reduzieren (48-50). Desweiteren konnte gezeigt werden, daß sogenannte "mobilisierte" periphere Blutstammzellen nach Hochdosistherapie zu einer schnelleren Erholung der Hämatopoese führten (51, 52).

### **1.3. Das CD34 Antigen**

Die Entdeckung des Antigens CD34, das auf der Oberfläche hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks und des peripheren Blutes exprimiert wird, war von herausragender Bedeutung für das Verständnis der Physiologie der Blutbildung (53-55). Unter Ruhebedingungen sind etwa 1-4% der kernhaltigen Zellen im Knochenmark, jedoch nur 0,01-0,04% der Leukozyten des peripheren Blutes CD34-positiv (CD34+). Die Bestimmung der CD34+ Zellen erfolgt meistens durchflußzytometrisch und gehört an Transplantationszentren zur Routinediagnostik (56, 57). Mehr als 90% der CD34+ Zellen sind als determinierte Vorläuferzellen der Hämatopoese anzusehen, da sie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung nicht mehr besitzen. Im Gegensatz hierzu besitzen die pluripotenten Blutstammzellen die Fähigkeit zur dauerhaften Rekonstitution aller Zellreihen der Hämatopoese. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, daß etwa 100 solcher hochgereinigten Zellen zur kompletten Rekonstitution der Hämatopoese führten (58).

### **1.4. Mobilisation autologer Blutstammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut**

#### **1.4.1. Mobilisation durch zytostatische Medikamente**

Richman et al beschrieben erstmals bei Patienten mit soliden Tumoren den mobilisierenden Effekt einer intermittierenden zytostatischen Chemotherapie auf die

zirkulierenden Blutstammzellen, wobei sie eine 20-fache Erhöhung der CFU-GM im peripheren Blut beobachteten (59). In den folgenden Jahren wurde mehrfach gezeigt, daß eine zytostatische Chemotherapie einen positiven Effekt auf die Zahl der zirkulierenden Blutstammzellen hat (60-63). Schwartzberg et al fanden einen direkten Zusammenhang zwischen der Schwere der Myelosuppression und der Höhe der Zahl zirkulierender Blutstammzellen (64). Die Verabreichung von hohen Dosen CPM ( $7 \text{ g/m}^2$ ) bewirkte eine effiziente Mobilisation von Blutstammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut, war jedoch wegen der ausgeprägten Myelosuppression mit einer erheblichen Rate an Morbidität und Mortalität behaftet (65, 66). Durch die Verabreichung eines hämatopoetischen Wachstumsfaktors im Anschluß an die hochdosierte Therapie mit CPM konnte die Toxizität deutlich reduziert werden (67).

#### **1.4.2. Mobilisation durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren**

Eine wichtige Rolle für die Mobilisation von Blutstamm- und Vorläuferzellen spielte die Entdeckung der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (68-70). Im Gegensatz zu Zytostatika sind Granulozyten koloniestimulierender Faktor (G-CSF) und Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor (GM-CSF) in der Lage, ohne eine Zytopenie zu verursachen, die Zahl der CD34+ Zellen des peripheren Blutes um den Faktor 80 zu steigern (71-76). Hierbei besteht zwischen Zytokindosis und der Zahl der mobilisierten Stammzellen eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung (77-79). Zur Mobilisation peripherer Blutstammzellen werden in der Regel G-CSF (Neupogen<sup>®</sup>, Amgen, München, Granocyte<sup>®</sup>, Rhone-Poulenc Rorer, Köln) oder GM-CSF (Leucomax<sup>®</sup>, Essex Pharma, München) meistens in einer Dosierung von 5-24  $\mu\text{g/kg/d}$  subkutan verabreicht. Im klinischen Alltag hat sich in der Mobilisation peripherer Blutstammzellen G-CSF gegenüber GM-CSF, nicht zuletzt wegen der geringeren Nebenwirkungsrate, eindeutig durchgesetzt (80). Nach aktuellen Erkenntnissen wird empfohlen, die tägliche Gesamtdosis von G-CSF in zwei Dosen aufzuteilen (81). Dabei sollte allerdings bedacht werden, daß die Leukapherese erst einige Stunden nach der morgendlichen Dosis durchgeführt wird, da G-CSF paradoxerweise zunächst zu einem kurzfristigen Abfall der zirkulieren-

den CD34+ Zellen führt (82). Bei ausgeprägter Thrombozytopenie können G-CSF/GM-CSF als intravenöse Dauer- oder Kurzinfusion gegeben werden.

### **1.4.3. Mobilisation durch Chemotherapie und Wachstumsfaktoren**

Die Kombination von zytostatischer Chemotherapie und hämatopoetischem Wachstumsfaktor kann die Zahl der zirkulierenden Blutstammzellen um den Faktor 1.000 steigern (83). Deshalb werden die Blutstammzellen von Patienten, die an einer malignen Erkrankung leiden, häufig mit einer zytostatischen Chemotherapie und einem hämatopoetischen Wachstumsfaktor mobilisiert. Hierbei kommen entweder CPM ( $2-7 \text{ g/m}^2$ ) oder eine Polychemotherapie zur Anwendung (84-86). Die zytostatische Chemotherapie wird meistens an die individuelle maligne Erkrankung des Patienten adaptiert, um eine optimale Tumorreduktion vor der Hochdosistherapie zu erreichen (87-94). Die Gabe von G-CSF oder GM-CSF, meistens in einer Dosierung von  $5-10 \text{ } \mu\text{g/kg/d}$ , beginnt einen Tag nach Ende der Chemotherapie und wird bis zur letzten Stammzellsammlung fortgeführt.

### **1.5. "Monitoring" der zirkulierenden Blutstammzellen nach Mobilisation**

Die Bestimmung des optimalen Zeitpunkts der Einleitung der Leukapheresen nach Stammzellmobilisierung ist besonders wichtig. Nach Beendigung der Chemotherapie wird das Blutbild zunächst etwa alle zwei bis drei Tage bestimmt, um den tiefsten Wert der Leukozyten ("Nadir") zu erfassen. Sobald der Nadir durchschritten wird und/oder die Leukozyten über  $1.000/\mu\text{l}$  steigen, ist die Blutbildbestimmung täglich durchzuführen. Ab diesem Zeitpunkt soll die Zahl der zirkulierenden CD34+ Zellen mittels Durchflußzytometrie täglich bestimmt werden, um den Anstieg der CD34+ Zellen zu verfolgen, ihren Höchstwert zu erfassen und die Leukapheresen einzuleiten (95). Etwa 10 bis 14 Tage nach Ende der Mobilisierungschemotherapie erreichen die Stamm- und Vorläuferzellen im peripheren Blut mit bis zu  $1.000 \text{ CD34+ Zellen}/\mu\text{l}$  ihren Höchststand (Normalwert:  $1-4/\mu\text{l}$ ). Wegen der starken interindividuellen Streuung, auch innerhalb eines homogenen

Patientenkollektivs, lässt sich der Höchstwert für den einzelnen Patienten kaum voraussagen. Aus diesem Grunde gestaltet sich die Bestimmung des Zeitpunkts des Apheresebeginns recht schwierig.

## **1.6. Rekonstitution der Blutbildung nach Hochdosistherapie und Transplantation von autologen hämatopoetischen Stammzellen**

Die zur Behandlung einer malignen Erkrankung eingesetzte Hochdosischemo-/Radiotherapie führt zu einer tiefen Myelosuppression. In dieser Zeit ist der Patient durch Infektionsrisiko, Blutungsneigung aber auch durch die nichthämatopoetische Toxizität gefährdet. Die intravenös verabreichten Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks oder des peripheren Blutes gelangen aus dem Blutkreislauf in das Knochenmark des Patienten, nisten sich dort ein und bringen die Hämatopoese erneut in Gang (2, 96). In der klinischen Routine wird von dem Tag an mit einem Angehen des Transplantats ("Engraftment") gerechnet, an dem Blutwerte mit Leukozyten  $>1.000/\mu\text{l}$ , Granulozyten  $>500/\mu\text{l}$  und Thrombozyten  $>20.000/\mu\text{l}$  erstmals erreicht werden und über diesem Niveau verbleiben. Dabei wird der Transplantationstag als Tag 0 bezeichnet.

### **1.6.1. Hämatopoetische Regeneration nach autologer Knochenmarktransplantation**

Die Erholung der Hämatopoese nach Hochdosischemo-/Radiotherapie und autologer Knochenmarktransplantation erfolgt in der Regel nach etwa zwei bis drei Wochen mit Granulozyten  $>500/\mu\text{l}$  und drei bis vier Wochen mit Thrombozyten  $>20.000/\mu\text{l}$  (97, 98). Hierbei wird der reinfundierten Dosis an MNC/kg und/oder CFU-GM/kg eine prädiktive Rolle für die Rekonstitution der autologen Hämatopoese nach Hochdosistherapie zugeschrieben (99-101). Diese Ansicht wird jedoch nicht von allen Forschergruppen geteilt (102).

### **1.6.2. Hämatopoetische Regeneration nach Transplantation von autologen peripheren Blutstammzellen**

Die hämatopoetische Rekonstitution nach einer Hochdosistherapie und Übertragung peripherer Blutstammzellen hängt davon ab, ob die Zellen im "steady state" oder im Anschluß an eine Mobilisation gewonnen wurden. Blutstammzellen aus dem "steady state" sind nicht in der Lage ein schnelleres "Engraftment" zu ermöglichen als Knochenmarkzellen (103). Im Vergleich zur autologen Knochenmarktransplantation erfolgt die hämatopoetische Regeneration nach Reinfusion von "mobilisierten" peripheren Blutstammzellen in einem signifikant kürzeren Zeitraum (9, 10, 104, 105). Nach Reinfusion des "mobilisierten" Stammzelltransplantats kann im Regelfall in 1 bis 2 Wochen mit der Rekonstitution der Granulozyten  $>500/\mu\text{l}$  und Thrombozyten  $>20.000/\mu\text{l}$  gerechnet werden. Dies beruht wahrscheinlich sowohl auf quantitativen als auch qualitativen Unterschieden, wie Zahl und Zusammensetzung der hämatopoetischen Stammzellen der beiden Transplantatformen. Um das hämatopoetische Potential eines peripheren Blutstammzellprodukts abzuschätzen, wird die Bestimmung folgender Zelldosen empfohlen: MNC/kg, CD34+ Zellen/kg und CFU-GM/kg (106). Von diesen Parametern hat sich die Zahl der übertragenen CD34+ Zellen als der beste prädiktive Faktor für die Regeneration der Blutbildung durchgesetzt. Bei der autologen Transplantation von peripheren Blutstammzellen nach Hochdosistherapie ist eine schnelle und dauerhafte hämatologische Rekonstitution nach Reinfusion einer Mindestmenge von  $2,0\text{-}2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg zu erwarten (107-111). Einige Autoren empfehlen die Rückgabe von mehr als  $5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg, um vor allem die Thrombopoese weiter zu beschleunigen (112-114).

### **1.7. Hochdosischemotherapie und Transplantation autologer Blutstammzellen bei Patienten mit malignen Keimzelltumoren**

Die malignen Keimzelltumoren des Mannes sind prinzipiell chemotherapiesensibel. Die Behandlung mit einer Standard-Chemotherapie führt in 70-80% der Patienten zu

langfristigen Remissionen (115). Allerdings gibt es zwei Patientengruppen, die eine deutlich schlechtere Prognose haben: Patienten, die nach einer Chemotherapie rezidivieren und Patienten, die bei Primärdiagnose eine fortgeschrittene Metastasierung ("advanced disease") aufweisen. Experimentelle Studien haben bei Rezidiven gezeigt, daß eine höherdosierte Gabe von Etoposid und Ifosfamid bei Patienten zu Remissionen führte, die auf eine vorausgehende Standarddosis-Chemotherapie mit Etoposid und Ifosfamid kein Ansprechen gezeigt hatten (116, 117). Obwohl Ergebnisse einer randomisierten Studie zur Hochdosischemotherapie bei rezidivierten und/oder refraktären Keimzelltumoren bislang fehlen, legen die bisherigen Studien nahe, daß eine solche Therapie das Langzeitüberleben dieser Patienten von etwa 20% nach konventioneller "salvage" Chemotherapie auf 40-50% verbessern kann (118-120). Trotz einer Vielzahl offener Fragen wie Zeitpunkt der Hochdosischemotherapie (erstes oder zweites Rezidiv), Anzahl der zu applizierenden Behandlungen (ein oder zwei Zyklen) und Art des optimalen Hochdosistherapieregimes, hat sich diese Therapiemodalität in vielen Ländern etabliert (121). Solange jedoch keine randomisierten Studienergebnisse vorliegen, sollte eine Hochdosischemotherapie zur Behandlung von Patienten mit Keimzelltumoren nur im Rahmen von prospektiven Studien an spezialisierten Zentren durchgeführt werden.

## **2. Patienten und Methoden**

### **2.1. Patientenkollektiv**

Von Januar 1993 bis Juli 1998 wurden 137 Männer mit rezidivierten und/oder refraktären malignen Keimzelltumoren in der Abteilung Innere Medizin mit Schwerpunkt Hämatologie/Onkologie (Leiter: Prof. Dr. med. D. Huhn), Universitätsklinikum Charité/Virchow-Klinikum, Humboldt-Universität Berlin, mit drei bis vier Zyklen einer konventionellen "salvage" Chemotherapie behandelt. Die Separation peripherer Blutstammzellen erfolgte nach dem ersten Zyklus der Chemotherapie, bei Bedarf auch nach weiteren Zyklen. Siebzehn Patienten konnten für die vorliegende Analyse wegen unvollständiger Datendokumentation oder Progression ihrer Erkrankung nicht berücksichtigt werden, da bei Nichtansprechen der Krankheit auf eine Blutstammzellseparation und Hochdosischemotherapie in der Regel verzichtet wurde. Somit verblieben 120 Patienten für die Analyse zur Mobilisation und Separation zirkulierender Blutstammzellen. Von diesen Patienten wurden 101 Patienten nach Abschluß der konventionellen "salvage" Chemotherapie einer Hochdosischemotherapie mit nachfolgender Transplantation autologer Blutstammzellen zugeführt. Letztlich konnten 96 Patienten in die Analyse der hämatopoetischen Rekonstitution und der Supportivtherapie aufgenommen werden.

### **2.2. Mobilisierungstherapie**

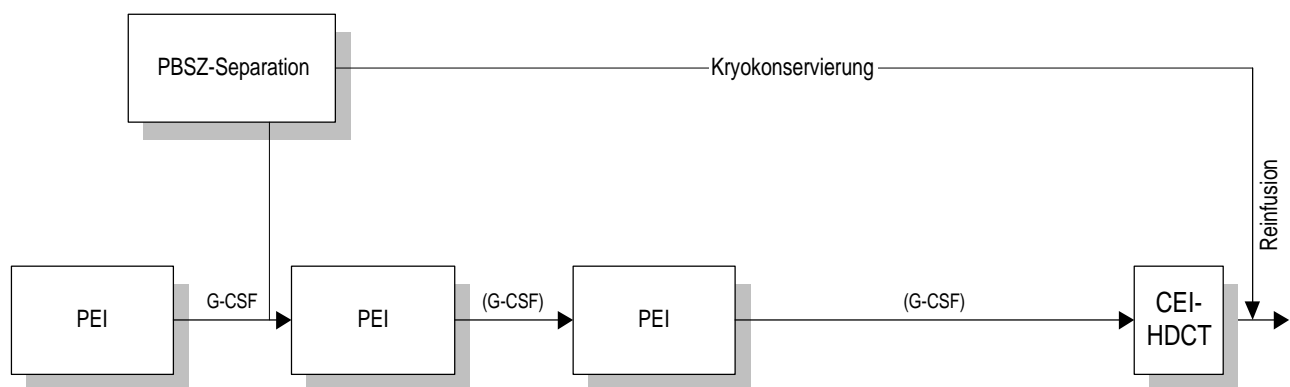
Es wurden drei "salvage" Chemotherapieregime zur Mobilisation peripherer Blutstammzellen eingesetzt:

1. Cisplatin, Etoposid, Ifosfamid (PEI).
2. Taxol, Ifosfamid, Cisplatin (TIP).
3. Taxol, Ifosfamid (TI).

Einen Tag nach Beendigung der Chemotherapie erfolgte die erste subkutane Gabe von G-CSF: Patienten mit PEI und TIP erhielten 5 µg/kg/d und TI-Patienten 10 µg/kg/d. Die Applikation von G-CSF wurde in gleicher Dosierung bis zum Abschluß der Apheresen fortgeführt.

### 2.2.1. Cisplatin, Etoposid und Ifosfamid (PEI)

Sechshundsechzig Patienten erhielten drei Zyklen PEI mit jeweils Cisplatin 20 mg/m<sup>2</sup>, Etoposid 100 mg/m<sup>2</sup> und Ifosfamid 1,2 g/m<sup>2</sup> an den Tagen 1-5 (Abbildung 1). Cisplatin und Etoposid wurden als 1-h-Infusion, Ifosfamid als 2-h-Infusion verabreicht.



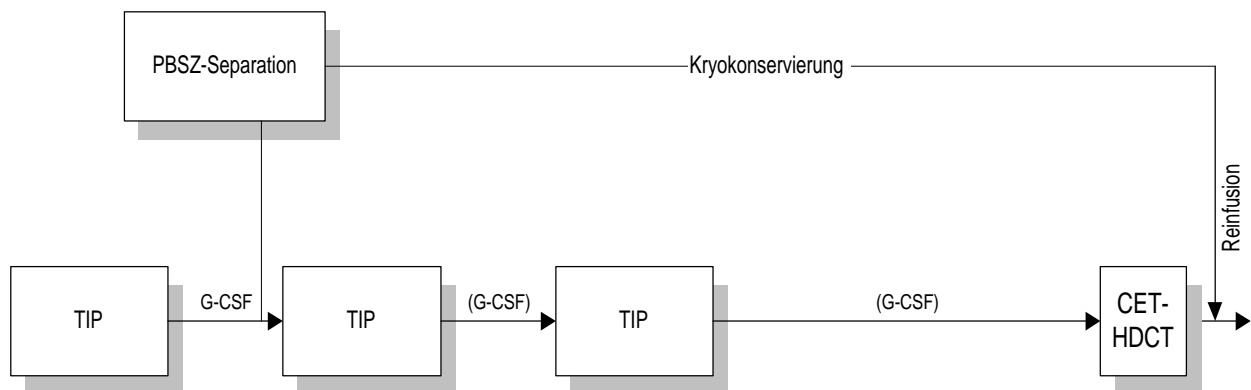
**Abbildung 1. Ablauf der chemotherapeutischen Behandlung mit PEI und Hochdosis-CEI (Carboplatin, Etoposid, Ifosfamid)**

### 2.2.2. Taxol, Ifosfamid und Cisplatin (TIP)

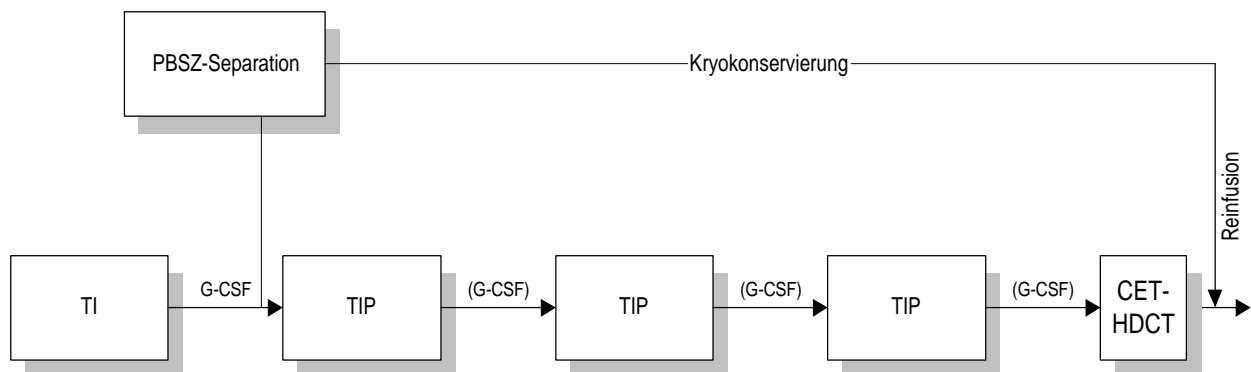
Sechszwanzig Patienten wurden mit drei Zyklen TIP und jeweils Taxol 175 mg/m<sup>2</sup> (1-h-Infusion) am Tag 1, Ifosfamid 1,2 g/m<sup>2</sup> (2-h-Infusion) und Cisplatin 20 mg/m<sup>2</sup> (1-h-Infusion) an den Tagen 2-6 behandelt (Abbildung 2).

### 2.2.3. Taxol und Ifosfamid (TI)

Achtundzwanzig Patienten erhielten einen Zyklus TI mit Taxol  $175 \text{ mg/m}^2$  als 1-h-Infusion und Ifosfamid  $5,0 \text{ g/m}^2$  als 22-h-Infusion am Tag 1. Darauf folgten drei weitere Zyklen TIP (Abbildung 3).



**Abbildung 2. Ablauf der chemotherapeutischen Behandlung mit TIP und Hochdosis-CET (Carboplatin, Etoposid, Thiotepa)**



**Abbildung 3. Ablauf der chemotherapeutischen Behandlung mit TI/TIP und Hochdosis-CET (Carboplatin, Etoposid, Thiotepa)**

### **2.3. Bestimmung zirkulierender Blutstammzellen**

Die Zahl der peripheren Blutstammzellen wurde im Labor für Durchflußzytometrie (Prof. Dr. med. S. Serke), Abteilung Innere Medizin mit Schwerpunkt Hämatologie/Onkologie, Virchow-Klinikum, Humboldt-Universität, durch den Nachweis des Antigens CD34 auf der Oberfläche der Leukozyten bestimmt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Zur Beschreibung der Methodik sei an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen (57, 122).

### **2.4. Separation zirkulierender Blutstammzellen**

Die Sammlung der peripheren Blutstammzellen wurde mittels Leukapherese an den Zellseparatoren Fresenius AS104<sup>®</sup> (Fresenius NPBI, Dreieich) oder COBE Spectra<sup>®</sup> (COBE BCT, Planegg-Martinsried) durchgeführt (123, 124). Während einer 150-270 minütigen Leukapherese wurden im Median 11 l (6-16) Venenblut mit einer Geschwindigkeit von 40-70 ml/min über zwei Kubitalvenen der Arme oder einen doppeläufigen zentralvenösen Katheter, jeweils für Entnahme und Rückgabe, prozessiert. Um katheterassoziierte Komplikationen wie Thrombose, Infektion, Blutung und Pneumothorax, sowie die Gabe von Heparin zur Katheterpflege zu vermeiden, wurden wenn möglich periphere Venenzugänge gelegt. Bei schlechten Venenverhältnissen erfolgten die Leukapheresen über großvolumige Katheter (GamCath Catheters<sup>®</sup>, JOKA GmbH, Hechingen).

### **2.5. Kryokonservierung und Lagerung peripherer Blutstammzellen**

Vor der Kryokonservierung wurden die Leukaphereseprodukte gegebenenfalls durch Zentrifugation (2.000 U/min, 10 min) auf ein Volumen von etwa 70 ml eingestellt und in einen Kryokonservierungsbeutel überführt (Gambro, Hechingen; Baxter Biotech, Unterföhring). Kurz vor Beginn des Einfriervorgangs wurden 30 ml einer gekühlten Dimethylsulfoxid Lösung (DMSO 33,3%, Apotheke, Virchow-Klinikum) zur ebenfalls vorgekühlten

Zellsuspension in den Einfrierbeutel gegeben. Nach gründlichem Durchmischen wurden drei bis fünf Pilotröhrchen mit jeweils 1 ml Zellsuspension gefüllt, um zu einem späteren Zeitpunkt Analysen aus kryokonserviertem/aufgetautem Material durchführen zu können. Der kontrollierte Einfriervorgang, wobei in 85 min  $-101^{\circ}\text{C}$  erreicht wurde, fand in einem automatischen Gerät statt (Messer Griesheim, Mudersbach). Danach wurden die Blutstammzellprodukte und Pilotröhrchen in einen speziellen Tank mit flüssigen Stickstoff ( $\text{N}_2$ ) eingelagert ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

## **2.6. Laboratoriumsuntersuchungen zur Qualitätskontrolle der Stammzellprodukte**

### **2.6.1. Untersuchungen vor Kryokonservierung**

Folgende Parameter wurden vor Kryokonservierung aus den Leukaphereseprodukten bestimmt: Leukozyten/ $\mu\text{l}$ , Thrombozyten/ $\mu\text{l}$ , Hämoglobin mg/dl und Hämatokrit (%) am Zell-Analysegerät NE-7000<sup>®</sup> (TOA Sysmex, Kobe, Japan), MNC (%) nach mikroskopisch-manueller Auswertung von May-Grünwald gefärbten Blutaussstrichen und CD34+ Zellen am Durchflußzytometer (FACScan<sup>®</sup>, Becton Dickinson, San Jose, USA). Die Gesamtzahl der MNC und CD34+ Zellen des jeweiligen Blutstammzellprodukts ergab pro kg Körpergewicht die gesammelte individuelle Zelldosis eines Patienten. Desweiteren wurden für die Sterilitätsprüfung der einzelnen Produkte aerobe und anaerobe Blutkulturflaschen (BCB System<sup>®</sup>, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen) mit jeweils 1 ml Zellsuspension beimpft und an das Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Virchow-Klinikum, Humboldt-Universität, weitergeleitet (125).

### **2.6.2. Untersuchungen nach Kryokonservierung**

Aus dem Inhalt von kryokonservierten/aufgetauten Pilotröhrchen eines jeden Stammzellprodukts wurde der Anteil vitaler Zellen bestimmt und ihre Wachstumsfähigkeit im

Kolonie-Assay untersucht (126). Die Vitalitätsprüfung erfolgte durch die Trypanblau-Färbung, wobei tote Zellen durch den Farbstoff blau gefärbt erschienen und von den hell leuchtenden vitalen Zellen unterschieden werden konnten. Vor einer geplanten Hochdosischemotherapie wurden zur Prüfung der Wachstums- und Teilungsfähigkeit der kryokonservierten/aufgetauten Blutstammzellen Kulturen in Methylzellulose angelegt um hämatopoetische Kolonien zu züchten: granulozytäre/monozytäre Kolonien (CFU-GM: colony-forming units granulocyte-macrophage) und erythrozytäre Kolonien (BFU-E: burst-forming units erythrocyte). Hierbei wurde der Inhalt eines aufgetauten Pilot-röhrchens (1 ml) in ein 10 ml Falcon-Röhrchen gegeben, mit 9 ml RPMI Lösung aufgefüllt und bei 2.000 U/min für 10 min ohne Bremse zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstands erfolgte die Resuspension der Zellen in RPMI Lösung. Danach wurde die Zellsuspension über einen Dichtegradienten (Ficoll) gegeben. Durch Zentrifugation ohne Bremse (15 min, 2.500 U/min) erfolgte die Anreicherung der MNC in der Interphase. Nach Abpipettieren der Interphase folgten zum Auswaschen des Dichtegradienten die Aufnahme der Zellen in RPMI Lösung und eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 2.000 U/min. Nach Dekantieren des Überstands und Resuspension der Zellen in Iscove's modified medium (IMDM) Lösung wurde als nächster Schritt die Bestimmung der Zellzahl mit Türk'scher Lösung in der Schilling-Kammer unter einem Phasen-contrastmikroskop durchgeführt (10 µl Zellsuspension plus 90 µl Türk'sche Lösung). Danach folgte die Zugabe von  $3 \times 10^5$  MNC in ein Röhrchen mit 2,5 ml Methylzellulose. Aus dem MNC-Methylzellulose-Gemisch wurde 1,2 ml pro Vertiefung einer Falcon Gewebekulturplatte gegeben, die vorher mit 25 µl (62,5 µg) GM-CSF, 10 µl (1,25 U) Erythropoietin und 25 µl einer Antibiotika-Antimykotikum-Lösung mit Penicillin (10.000 U/ml), Streptomycin (10 mg/ml) und Amphotericin B (25 µg/ml) beschickt worden war. Jede Kultur wurde im Doppelansatz angelegt und die Kulturplatten 14 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bebrütet. Die Bestimmung der Kolonien (CFU-GM, BFU-E) erfolgte unter einem Umkehrmikroskop, wobei Zellhaufen mit mehr als 50 Zellen als Kolonie gewertet wurden. Aus der CFU-GM-Koloniezahl des Doppelansatzes wurde der Mittelwert berechnet und nach folgender Formel die Gesamtkoloniezahl pro Leukapherese bestimmt:

Anzahl CFU-GM pro Kulturansatz × Gesamtzahl MNC pro Stammzellprodukt

$$10^5$$

Die berechnete Zahl an CFU-GM wurde durch das Körpergewicht des Patienten geteilt, um die individuelle CFU-GM-Dosis pro kg zu erhalten.

## **2.7. Hochdosischemotherapie**

Es kamen zwei Chemotherapieregime zur Anwendung:

1. Carboplatin, Etoposid und Ifosfamid (CEI).
2. Carboplatin, Etoposid und Thiotepa (CET).

Nach Beendigung der Hochdosischemotherapie folgten ein bis zwei Tage Pause, danach erfolgte die Reinjektion der gefrorenen/aufgetauten Blutstammzellen (Tag 0). Ab Tag +1 wurde G-CSF als kontinuierliche Infusion verabreicht (5 µg/kg/d).

### **2.7.1. Carboplatin, Etoposid und Ifosfamid (CEI)**

Von 66 Patienten, die mit PEI als konventionelle Chemotherapie behandelt wurden, erhielten 57 Patienten Hochdosis-CEI in der folgenden kumulativen Dosierung: Carboplatin 1.500 mg/m<sup>2</sup>, Etoposid 2.400 mg/m<sup>2</sup> und Ifosfamid 10 g/m<sup>2</sup>. Carboplatin wurde als 1-h-Infusion an drei Tagen (500 mg/m<sup>2</sup>/d), Etoposid als 1-h-Infusion an vier Tagen (600 mg/m<sup>2</sup>/d) und Ifosfamid als 22-h-Infusion an vier Tagen (2.500 mg/m<sup>2</sup>/d) verabreicht (Tabelle 1).

### **2.7.2. Carboplatin, Etoposid und Thiotepa (CET)**

Von 55 Patienten mit TIP oder TI/TIP als "salvage" Chemotherapie erhielten 44 Patienten

Hochdosis-CET in der folgenden kumulativen Dosierung: Carboplatin  $1.500 \text{ mg/m}^2$ , Etoposid  $2.400 \text{ mg/m}^2$  und Thiotepa  $450 \text{ mg/m}^2$ . Carboplatin wurde als 1-h-Infusion an drei Tagen ( $500 \text{ mg/m}^2/\text{d}$ ), Etoposid als 1-h-Infusion an vier Tagen ( $600 \text{ mg/m}^2/\text{d}$ ) und Thiotepa als 1-h-Infusion an drei Tagen ( $150 \text{ mg/m}^2/\text{d}$ ) appliziert (Tabelle 2).

## **2.8. Auftauen und Reinjektion autologer Blutstammzellen**

Am Tag der Rückgabe der Blutstammzellen (Tag 0), wurden die tiefgefrorenen Aphereseprodukte in einem Behälter mit flüssigem  $\text{N}_2$  auf die Station transportiert. Kurz vor der geplanten Reinjektion erfolgte ein rasches Auftauen der gefrorenen Produkte in einem Wasserbad bei  $40^\circ\text{C}$ . Die Zellsuspension wurde in 50-ml-Spritzen aufgezogen und sofort über einen zentralvenösen Katheter dem Patienten injiziert. Schließlich wurden die leeren Kryokonservierungsbeutel mit je 5-10 ml Kochsalzlösung ausgespült, der Inhalt in aerobe/anaerobe Blutkulturflaschen gespritzt und zur Sterilitätstestung an das Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Virchow-Klinikum, Humboldt-Universität, geschickt.

**Tabelle 1. Zeitlicher Ablauf der Hochdosischemotherapie CEI**

Tag -6	Tag -5	Tag -4	Tag -3	Tag -2/ -1	Tag 0	Tag +1
Carboplatin 500 mg/m <sup>2</sup>	Carboplatin 500 mg/m <sup>2</sup>	Carboplatin 500 mg/m <sup>2</sup>		Pause		
Etoposid 600 mg/m <sup>2</sup>	Etoposid 600 mg/m <sup>2</sup>	Etoposid 600 mg/m <sup>2</sup>	Etoposid 600 mg/m <sup>2</sup>			
Ifosfamid 2,5 g/m <sup>2</sup>	Ifosfamid 2,5 g/m <sup>2</sup>	Ifosfamid 2,5 g/m <sup>2</sup>	Ifosfamid 2,5 g/m <sup>2</sup>			
					Stammzell- Reinjektion	
						G-CSF 5 µg/kg/d

**Tabelle 2. Zeitlicher Ablauf der Hochdosischemotherapie CET**

Tag -6	Tag -5	Tag -4	Tag -3	Tag -2/ -1	Tag 0	Tag +1
Carboplatin 500 mg/m <sup>2</sup>	Carboplatin 500 mg/m <sup>2</sup>	Carboplatin 500 mg/m <sup>2</sup>		Pause		
Etoposid 600 mg/m <sup>2</sup>	Etoposid 600 mg/m <sup>2</sup>	Etoposid 600 mg/m <sup>2</sup>	Etoposid 600 mg/m <sup>2</sup>			
Thiotepa 150 mg/m <sup>2</sup>	Thiotepa 150 mg/m <sup>2</sup>	Thiotepa 150 mg/m <sup>2</sup>				
					Stammzell- Reinjektion	
						G-CSF 5 µg/kg/d

## 2.9. Anwachsen des Transplantats ("Engraftment")

Gerechnet ab dem Tag der Reinjektion der kryokonservierten/aufgetauten Blutstammzellen (Tag 0) wurde das "Engraftment" jenem Tag zugeschrieben, an dem der Patient in der Posttransplantationsphase erstmals Leukozyten  $>1.000/\mu\text{l}$ , Granulozyten  $>500/\mu\text{l}$  und Thrombozyten  $>20.000/\mu\text{l}$  im peripheren Blut erreicht hat und im weiteren Verlauf des stationären Aufenthalts die Zellzahlen über diesem Niveau blieben.

## 2.10. Supportivtherapie

Patienten erhielten vor Beginn der Hochdosischemotherapie ab Tag  $-7$  eine tägliche Prophylaxe p.o. mit  $3 \times 250$  mg Ciprofloxacin (Ciprobay<sup>®</sup>, Bayer, Leverkusen),  $3 \times 500$  mg Aciclovir (Zovirax<sup>®</sup>, Glaxo Wellcome, Hamburg) und 30 ml Amphotericin B (Ampho-Moronal<sup>®</sup> Suspension, Bristol-Myers Squibb, München). Bei Auftreten von Temperaturen  $\geq 38^\circ\text{C}$  wurde die antibiotische Therapie mit Ciprofloxacin abgesetzt und durch tägliche Gaben von  $3 \times 2$  g Cefotaxim (Claforan<sup>®</sup>, Hoechst, Bad Soden) i.v. und  $3 \times 4$  g Piperacillin (Pipril<sup>®</sup>, Lederle, Münster) i.v. oder durch  $3 \times 2$  g Ceftazidim (Fortum<sup>®</sup>, Cascan/Glaxo Wellcome, Hamburg) i.v. und  $3 \times 4,5$  g Piperacillin-Tazobactam (Tazobac<sup>®</sup>, Lederle, Münster) ersetzt. Bei Nichtansprechen kam spätestens nach zwei Tagen zusätzlich Vancomycin (Vancomycin CP Lilly<sup>®</sup>, Lilly, Bad Homburg) in einer täglichen Dosierung von  $4 \times 500$  mg zur i.v. Anwendung. Bei weiterhin persistierendem Fieber wurden Cefotaxim/Piperacillin oder Ceftazidim/Piperacillin-Tazobactam durch tägliche i.v. Gaben von  $3 \times 1$  g Imipenem (Zienam<sup>®</sup>, MSD, Haar) oder  $3 \times 1$  g Meropenem (Meronem<sup>®</sup>, Zeneca/ Grünenthal, Stolberg) ersetzt. Bei begründetem Verdacht auf eine Pilzinfektion und/oder anhaltender Nichtentfieberung wurde zusätzlich Amphotericin B (Amphotericin B<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb, München) in einer täglichen Dosis von  $0,5$  mg/kg i.v. verabreicht. Um den Hämoglobinwert auf  $\geq 8$  g/dl anzuheben und über diesem Niveau zu halten erhielten die Patienten Erythrozytenkonzentrate. HLA-A/-B kompatible Thrombozyten-konzentrate wurden gegeben um die Thrombozyten  $\geq 10.000/\mu\text{l}$  oder bei

Fieber/Infektion und/oder Blutungszeichen  $\geq 20.000/\mu\text{l}$  zu halten. Alle transfundierten Blutprodukte waren leukozytendepletiert und mit 30 Gray bestrahlt. Um die hämatopoetische Regeneration zu beschleunigen, verabreichte man G-CSF ab Tag +1 als kontinuierliche Infusion in einer täglichen Dosierung von  $5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ . G-CSF wurde abgesetzt, wenn die Leukozyten über  $5.000/\mu\text{l}$  stiegen. Während des Posttransplantationsverlaufs wurde die Anzahl der Fiebertage und Antibiotikage, die transfundierten Erythrozyten- und Thrombozyten-konzentrate sowie die Dauer des Krankenhausaufenthalts erfaßt.

## **2.11. Dokumentation und statistische Analysen**

Die Dokumentation der Patientendaten und klinischen Parameter erfolgte im Datenverarbeitungsprogramm dBASE IV<sup>®</sup> 1.5 (Borland International, USA). Die Apheresen wurden im Tabellenkalkulationsprogramm Excel<sup>®</sup> 97 (Microsoft Corporation, USA) dokumentiert. Die Analyse der Daten erfolgte im Statistikprogramm SPSS<sup>®</sup> 8.0 (SPSS Inc., USA). Statistische Signifikanz wurde bei  $p < 0,05$  angenommen.

### **2.11.1. Korrelationsanalysen**

Die Korrelationsanalysen wurden mit der nichtparametrischen Rangkorrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. Als Variablen dienten zum Beispiel die Zahl der peripheren CD34+ Zellen/ $\mu\text{l}$  und die Menge der gesammelten CD34+ Zellen/kg. Die Analysen erfolgten dann mit den entsprechenden Datenpaaren der einzelnen Leuka-pheresen.

### **2.11.2. Analysen zur Mobilisation und Separation peripherer Blutstammzellen**

Folgende Zielvariablen wurden für die Mobilisation und Separation der zirkulierenden

Stammzellen definiert:

1. Zahl der zirkulierenden CD34+ Zellen/ $\mu$ l im peripheren Blut am ersten Apheresetag.
2. Menge an gesammelten CD34+ Zellen/kg am ersten Apheresetag.

Univariate Analyse:

Die abhängigen quantitativen Variablen wurden anhand des Medians in zwei annähernd gleich große Gruppen unterteilt. Die Codierung erfolgte jeweils mit 0 ( $\leq$  Median) oder 1 ( $>$  Median). Der U-Test nach Mann und Whitney wurde zum Vergleich der Gruppen in Bezug auf die Zielgrößen angewendet. Die qualitativen Variablen wurden in kategoriale Variablen transformiert (z. B. "salvage" Chemotherapie: 1/2/3) und mit dem H-Test nach Kruskal und Wallis im Hinblick auf die Zielvariablen auf Signifikanz überprüft. Bei Signifikanz wurden die einzelnen Gruppen mit dem Mann-Whitney Test miteinander verglichen.

Multivariate Analyse:

Zur Identifikation der Unabhängigkeit von signifikanten Variablen der univariaten Analyse wurde eine multiple lineare Regression mit schrittweiser Eliminierung der abhängigen Variablen durchgeführt. Folgende Modifikationen wurden für diese Analyse durchgeführt:

1. Eine logarithmische Transformation der Zielvariablen war notwendig, um eine Normalverteilung der Werte zu erreichen. Der Kolmogorov-Smirnov Test wurde zur Überprüfung der Normalverteilung angewendet. Normalverteilung wurde bei  $p < 0,05$  angenommen.
2. Die Mobilisationschemotherapie wurde anhand von drei Variablen untersucht, die jeweils mit der Codierung 0 (trifft nicht zu) oder 1 (trifft zu) versehen wurden.

### **2.11.3. Analysen zur hämatopoetischen Regeneration nach Hochdosistherapie**

Folgende Zielvariablen wurden für die hämatopoetische Regeneration definiert:

1. Anzahl der Tage bis zum Erreichen von Granulozyten  $>500/\mu$ l.
2. Anzahl der Tage bis zum Erreichen von Thrombozyten  $>20.000/\mu$ l.

#### Univariate Analyse:

Der univariate Vergleich der abhängigen Variablen in Bezug auf die Zielgrößen erfolgte nach der Methode von Kaplan-Meier mit dem log rank Test. Die Codierung der abhängigen Variablen erfolgte wie oben beschrieben.

#### Multivariate Analyse:

Zur Identifikation der Unabhängigkeit von signifikanten Variablen der univariaten Analyse wurde die Cox Regressionsanalyse mit Vorwärtselimination nach Wald durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Patienten

Es wurden drei Chemotherapieregime zur Mobilisierung peripherer Blutstammzellen eingesetzt: 66 Patienten erhielten Cisplatin, Etoposid, Ifosfamid (PEI), 26 Patienten Taxol, Ifosfamid, Cisplatin (TIP) und 28 Patienten Taxol, Ifosfamid (TI) (Tabelle 3).

**Tabelle 3. Patientencharakteristik bei Diagnosestellung**

	<b>PEI-Mobilisation (n=66)</b>	<b>TIP-Mobilisation (n=26)</b>	<b>TI-Mobilisation (n=28)</b>
<b>Alter (Jahre)</b>			
Median (Range)	<b>30 (14-48)</b>	<b>32 (19-49)</b>	<b>29 (20-58)</b>
<b>Tumorlokalisation</b>			
Gonadal	<b>55 (83%)</b>	<b>23 (88%)</b>	<b>22 (79%)</b>
Extragenital	<b>11 (17%)</b>	<b>3 (12%)</b>	<b>6 (21%)</b>
<b>Histologie</b>			
Seminom	<b>58 (88%)</b>	<b>24 (92%)</b>	<b>24 (86%)</b>
Nicht-Seminom	<b>8 (12%)</b>	<b>2 (8%)</b>	<b>4 (14%)</b>
<b>Stadium (Indiana)</b>			
Minimal	<b>12 (18%)</b>	<b>5 (19%)</b>	<b>3 (11%)</b>
Moderate	<b>13 (20%)</b>	<b>3 (12%)</b>	<b>9 (32%)</b>
Advanced	<b>41 (62%)</b>	<b>18 (69%)</b>	<b>16 (57%)</b>
<b>Cisplatin-Response</b>			
Absolut refraktär	<b>1 (1,5%)</b>	<b>1 (4%)</b>	<b>3 (11%)</b>
Refraktär	<b>9 (13,5%)</b>	<b>3 (12%)</b>	<b>5 (18%)</b>
Sensitiv	<b>52 (79%)</b>	<b>22 (84%)</b>	<b>20 (71%)</b>
Nicht evaluiert	<b>4 (6)</b>	–	–

In Tabelle 3 sind folgende Patientendaten, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erhoben wurden, in den drei Gruppen aufgeführt: Alter, Tumorlokalisation, Histologie, Krankheitsstadium (Indiana Klassifikation) und Ansprechen der Erkrankung auf die primäre cisplatinhaltige Chemotherapie. Tabelle 4 stellt das Krankheitsstadium der Patienten vor Beginn der Mobilisationschemotherapie und das Ansprechen der Erkrankung auf die "salvage" Chemotherapie in den Patientengruppen dar.

**Tabelle 4. Stadium der Erkrankung vor und nach der "salvage" Chemotherapie**

	<b>PEI-Mobilisation (n=66)</b>	<b>TIP-Mobilisation (n=26)</b>	<b>TI-Mobilisation (n=28)</b>
Status vor Chemotherapie			
CR	–	–	–
PR–	<b>3 (5%)</b>	–	–
PR+	<b>8 (12%)</b>	<b>7 (27%)</b>	<b>1 (4%)</b>
SD	<b>2 (3%)</b>	–	–
PD	<b>51 (77%)</b>	<b>19 (73%)</b>	<b>27 (96%)</b>
NE	<b>2 (3%)</b>	–	–
Chemotherapie-Response			
CR	<b>5 (8%)</b>	<b>3 (12%)</b>	<b>2 (7%)</b>
PR–	<b>24 (36%)</b>	<b>8 (30%)</b>	<b>15 (54%)</b>
PR+	<b>18 (27%)</b>	<b>9 (35%)</b>	<b>6 (21%)</b>
SD	<b>7 (11%)</b>	<b>2 (8%)</b>	<b>1 (4%)</b>
PD	<b>6 (9%)</b>	<b>4 (15%)</b>	<b>4 (14%)</b>
NE	<b>6 (9%)</b>	–	–

CR: komplette Remission; PR–: partielle Remission ohne Tumormarkererhöhung;

PR+: partielle Remission mit Tumormarkererhöhung; SD: stable disease; PD: progressive disease;

NE: nicht evaluiert.

### 3.1.1. Zytostatische Vorbehandlung

Alle Patienten waren im Rahmen der Primärtherapie zytostatisch vorbehandelt. Der statistische Vergleich der einzelnen Gruppen bezüglich Anzahl der Chemotherapiezyklen sowie der verabreichten kumulativen Dosen an Cisplatin, Etoposid, Ifosfamid und Bleomycin, ergab keinen signifikanten Unterschied (Tabelle 5).

**Tabelle 5. Chemotherapeutische Vorbehandlung**

	<b>Mobilisation mit PEI (n=66)</b>	<b>Mobilisation mit TIP (n=26)</b>	<b>Mobilisation mit TI (n=28)</b>
Chemotherapie Zyklen gesamt	<b>6</b> (3-14)	<b>6</b> (3-10)	<b>5</b> (3-8)
Cisplatin (mg/m <sup>2</sup> )	<b>550</b> (100-1.300)	<b>550</b> (250-1.000)	<b>490</b> (270-840)
Etoposid (mg/m <sup>2</sup> )	<b>2.500</b> (600-6.500)	<b>2.550</b> (1.250-5.300)	<b>2.400</b> (1.000-5.900)
Ifosfamid (g/m <sup>2</sup> )	<b>18</b> (2-70)	<b>25</b> (9-52)	<b>19</b> (6-47)
Bleomycin (mg/m <sup>2</sup> )	<b>180</b> (30-315)	<b>180</b> (40-275)	<b>180</b> (55-300)

es sind jeweils Median und Range angegeben

### 3.1.2. Mobilisation und Separation peripherer Blutstammzellen

Bei jeweils einem Patienten im PEI- und TI-Kollektiv mußte ein zweiter Chemotherapiezyklus zur Mobilisation peripherer Blutstammzellen durchgeführt werden, um

eine ausreichende Zelldosis zu gewinnen. Von 26 TIP-Patienten benötigten sieben Patienten zwei und ein Patient drei Mobilisationszyklen zur Stammzellsammlung. Patienten mit TI erhielten zur Stammzellmobilisierung eine signifikant höhere G-CSF-Dosis, als die beiden anderen Patientengruppen ( $p=0,001$ ;  $p=0,001$ ). Insgesamt wurden 251 Apheresen durchgeführt: 135 bei 66 PEI-Patienten, 74 bei 26 TIP-Patienten und 42 bei 28 TI-Patienten. Bei TI-Patienten konnten nach Beendigung der Chemotherapie die Apheresen signifikant früher eingeleitet werden als bei PEI- und TIP-Patienten: Tag 9 (8-17) versus Tag 14 (9-24) und Tag 15 (8-25) ( $p=0,001$ ;  $p=0,001$ ) (Tabelle 6, Abbildung 4).

**Tabelle 6. Mobilisationschemotherapie und Einleitung der Apheresen**

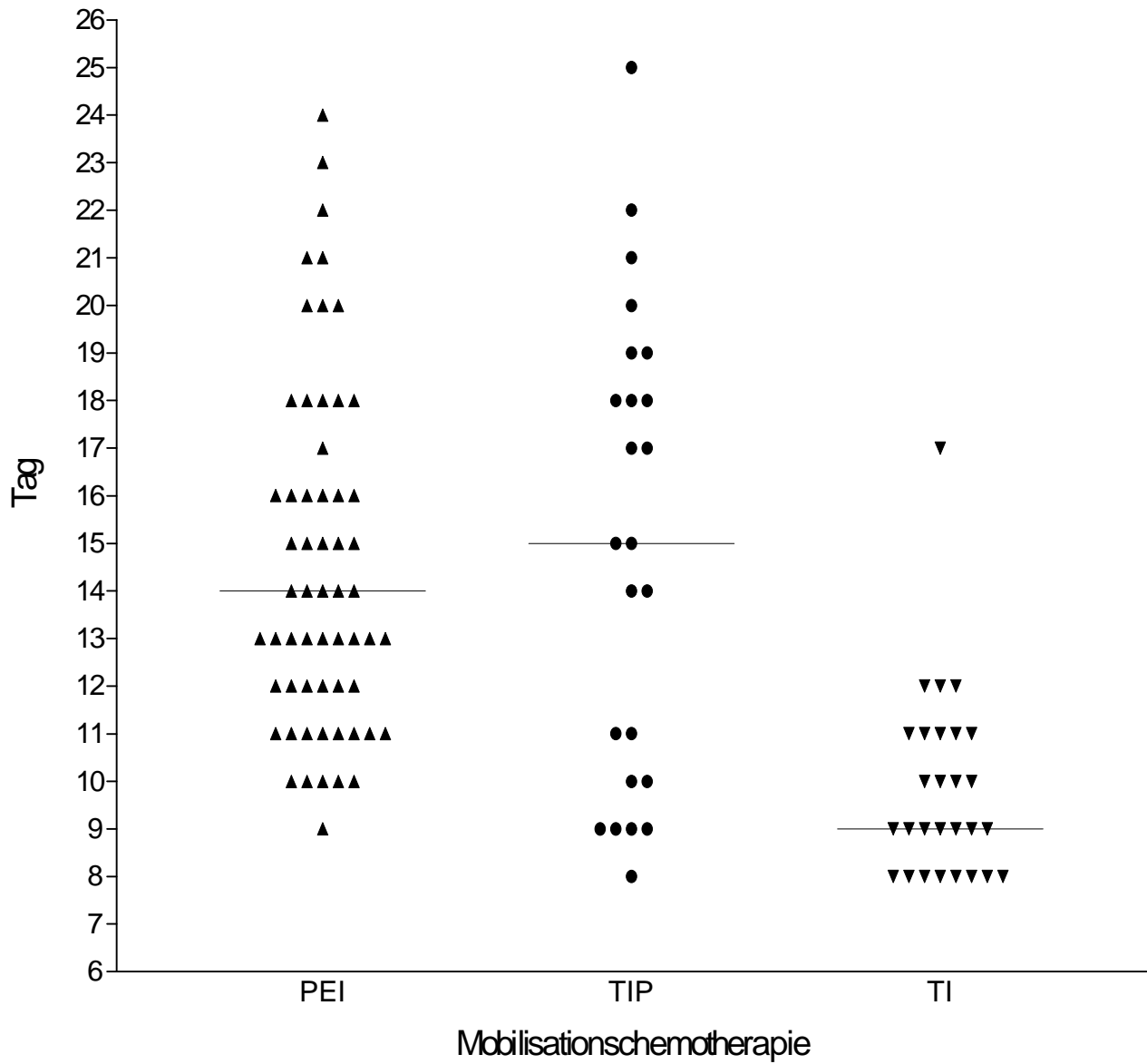
	<b>Mobilisation mit PEI (n=66)</b>	<b>Mobilisation mit TIP (n=26)</b>	<b>Mobilisation mit TI (n=28)</b>
Mobilisationszyklen Gesamt	67 <sup>#</sup>	35 <sup>³</sup>	29 <sup>&amp;</sup>
Leukapheresen Gesamt	135	74	42
G-CSF ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ ) (Median, Range)	<b>4,8</b> (2,9-7,5)	<b>5,8</b> (4,0-12,0)	<b>9,7</b> (7,3-11,8)
Apherese per Patient (Median, Range)	<b>2</b> (1-5)	<b>3</b> (1-7)	<b>1</b> (1-4)
1. Apherese-Tag* (Median, Range)	<b>14</b> (9-24)	<b>15</b> (8-25)	<b>9</b> (8-17)

<sup>#</sup>1 Patient mit 2 Mobilisierungszyklen

<sup>³</sup>7 Patienten mit 2 Mobilisierungszyklen und 1 Patient mit 3 Mobilisierungszyklen

<sup>&</sup>1 Patient mit 2 Mobilisierungszyklen

\*gerechnet ab Ende der Mobilisationschemotherapie



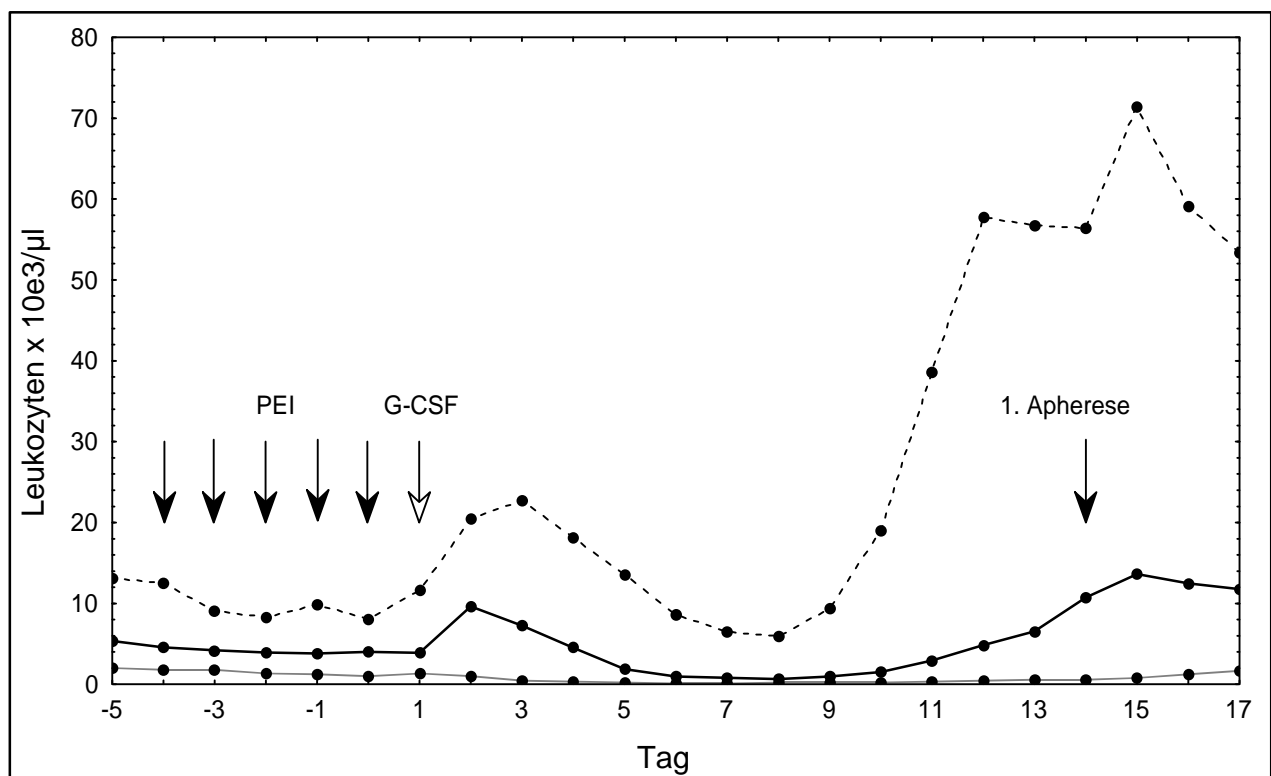
Medianwerte der einzelnen Gruppen sind durch Linien gekennzeichnet

**Abbildung 4. Einleitung der ersten Apherese nach Ende der Chemotherapie (Tag 0) in den einzelnen Patientengruppen**

### 3.1.3. Mobilisationschemotherapie und Leukozytenkinetik

#### 3.1.3.1. Mobilisation durch PEI und Verlauf der Leukozyten

Nach Beendigung von PEI (Tag -4 bis Tag 0) kam es durch die G-CSF Gabe ab Tag 1 zu einem kurzfristigen Anstieg der Leukozyten am Tag 2. Danach folgte ein kontinuierlicher Abfall der Leukozyten bis zum Nadir am Tag 8. Anschließend kam es zum stetigen Anstieg bis Tag 15, wobei die erste Apherese im Median am Tag 14 erfolgte (Abbildung 5).



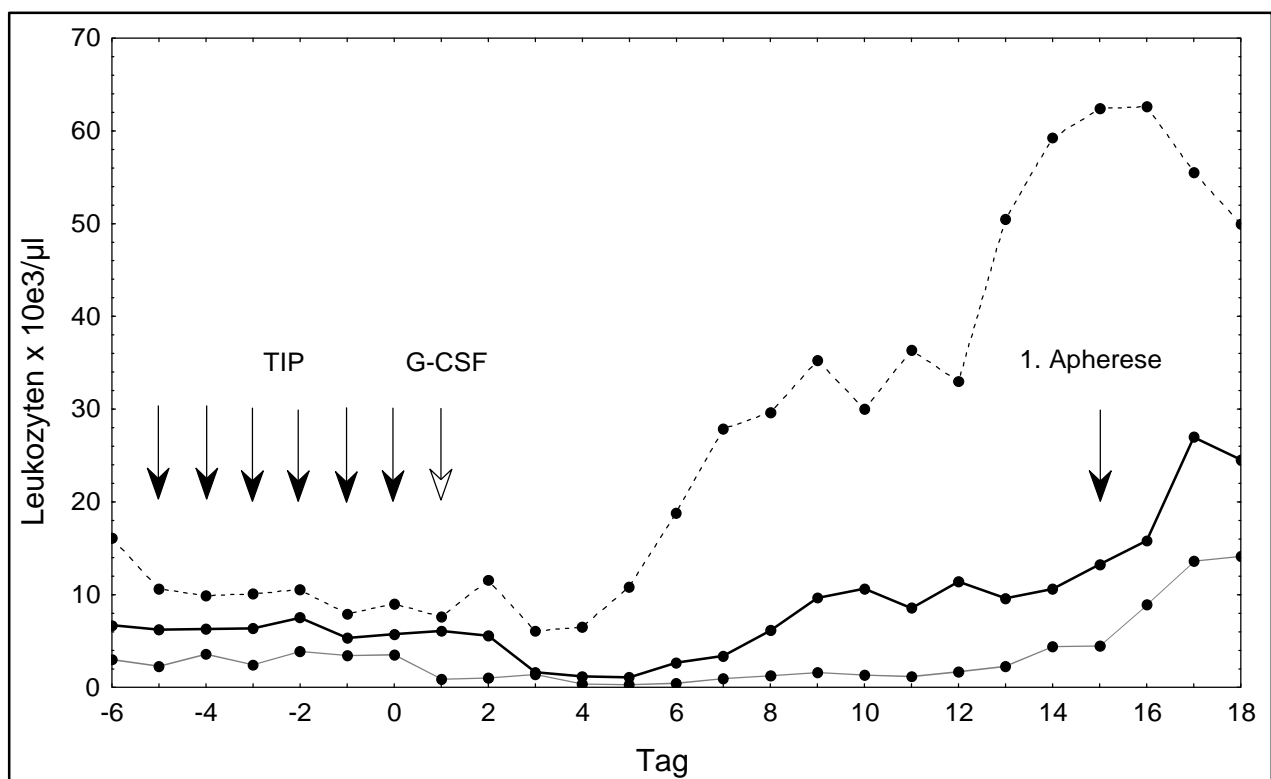
Tag -4 bis Tag 0: Cisplatin/Etoposid/Ifosfamid; ab Tag 1 bis Ende der Apheresen: G-CSF

Beginn der Blutstammzellseparationen (1. Apherese): Tag 14 (Median)

**Abbildung 5. Blutstammzellmobilisation durch Cisplatin, Etoposid und Ifosfamid: Verlauf der Leukozyten**

### 3.1.3.2. Mobilisation durch TIP und Verlauf der Leukozyten

Nach einem zunächst wellenförmigen Verlauf während TIP (Tag –5 bis Tag 0) wurde am Tag 5 der Leukozyten-Nadir erreicht. Danach folgte erneut ein wellenförmiger Verlauf mit Anstieg der Medianwerte bis zum Tag 17. In diesem Patientenkollektiv begannen die Leukapheresen im Median am Tag 15 nach Beendigung der Chemotherapie (Abbildung 6).



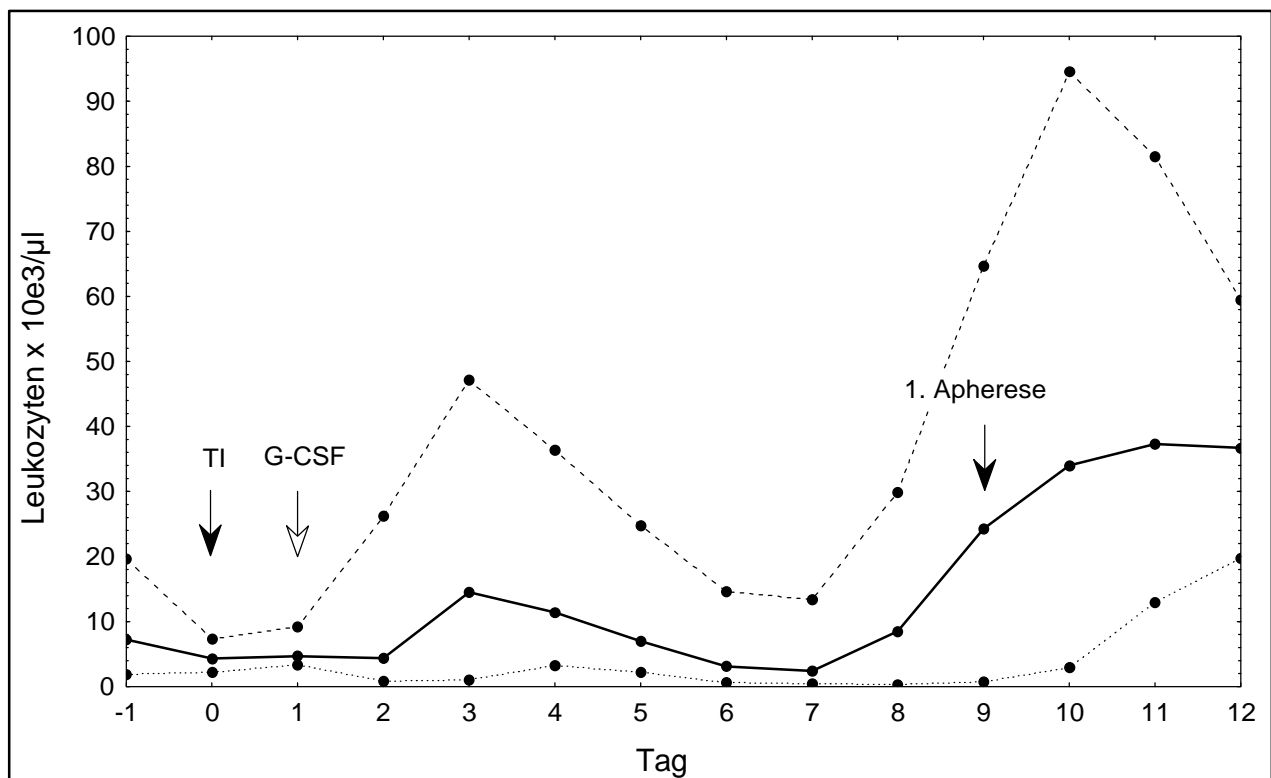
Tag –5: Taxol; Tag –4 bis Tag 0: Ifosfamid/Cisplatin (TIP); ab Tag 1 bis Ende der Apheresen: G-CSF

Beginn der Blutstammzellseparationen (1. Apherese): Tag 15 (Median)

**Abbildung 6. Blutstammzellmobilisation durch Taxol, Ifosfamid und Cisplatin: Verlauf der Leukozyten**

### 3.1.3.3. Mobilisation durch TI und Verlauf der Leukozyten

Nach der Chemotherapie mit TI (Tag 0) kam es zunächst zu einem passageren Anstieg der Leukozyten am Tag 3. Danach folgte ein kontinuierlicher Abfall mit dem Nadir am Tag 7. Anschließend kam es zu einem kräftigen, steilen Anstieg der medianen Leukozytenzahlen am Tag 9, der sich mit einem flacheren Verlauf bis Tag 11 fortsetzte. In dieser Patientengruppe wurden die Leukapheresen im Median am Tag 9 eingeleitet (Abbildung 7).



Tag 0: Taxol/Ifosfamid; ab Tag 1 bis Ende der Apheresen: G-CSF

Beginn der Blutstammzellseparationen (1. Apherese): Tag 9 (Median)

**Abbildung 7. Blutstammzellmobilisation durch Taxol und Ifosfamid: Verlauf der Leukozyten**

### 3.1.4. Einleitung der Leukapheresen

Am ersten Apheresetag waren die Leukozyten- und Thrombozytenzahlen bei PEI-Patienten signifikant niedriger als bei den anderen Patientengruppen (versus TIP:  $p=0,003$ ;  $p=0,001$ ; versus TI:  $p=0,001$ ;  $p=0,001$ ). Die Zahl der MNC war bei TI-Patienten signifikant höher als bei PEI- und TIP Patienten ( $p=0,04$ ;  $p=0,04$ ). Hinsichtlich der peripheren CD34+ Zellen ergab sich folgender Befund: TIP-Patienten hatten mit  $15,7/\mu\text{l}$  signifikant weniger als PEI- und TI-Patienten mit  $43,4/\mu\text{l}$  und  $60,5/\mu\text{l}$  ( $p=0,001$ ;  $p=0,001$ ). Der Unterschied zwischen der PEI- und TI-Gruppe war nicht signifikant (Tabelle 7).

**Tabelle 7. Blutzellzahlen am ersten Leukapheresetag**

	<b>Mobilisation mit PEI</b> <b>(n=66)</b>	<b>Mobilisation mit TIP</b> <b>(n=26)</b>	<b>Mobilisation mit TI</b> <b>(n=28)</b>
Leukozyten ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	<b>15,0</b> (3,5-71,4)	<b>27,7</b> (8,4-62,4)	<b>31,9</b> (3,6-94,6)
MNC ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	<b>3,3</b> (0,7-25,2)	<b>3,3</b> (1,3-8,8)	<b>4,0</b> (1,1-31,3)
Thrombozyten ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	<b>37,5</b> (9-351)	<b>98</b> (22-313)	<b>143</b> (34-449)
CD34+ Zellen ( $/\mu\text{l}$ )	<b>43,4</b> (3,6-668,6)	<b>15,7</b> (3,7-130,9)	<b>60,5</b> (6,6-876,0)

es sind jeweils Median und Range angegeben

### 3.1.5. Ergebnisse der Leukapheresen

Bei der ersten Apherese war die gesammelte Dosis an MNC/kg zwischen den

Patientengruppen nicht signifikant unterschiedlich. Bei CD34+ Zellen/kg wurden bei Patienten mit PEI und TI signifikant mehr gesammelt als bei TIP-Patienten ( $p=0,001$ ;  $p=0,001$ ). Die erste Apherese ergab bei TI-Patienten signifikant mehr CFU-GM/kg als bei PEI- und TIP-Patienten ( $p=0,002$ ;  $p=0,017$ ) (Tabelle 8).

Kumulative Apheresen erbrachten in der TI-Gruppe signifikant weniger MNC/kg als bei PEI- und TIP-Patienten ( $p=0,01$ ;  $p=0,03$ ). Die PEI-Gruppe hatte nach kumulativen Apheresen den höchsten Ertrag an CD34+ Zellen/kg im Vergleich zu TIP und TI ( $p=0,001$ ;  $p=0,04$ ). TI-Patienten hatten jedoch signifikant mehr CD34+ Zellen/kg als TIP-Patienten ( $p=0,02$ ). Die Sammlung von CFU-GM/kg durch kumulative Apheresen war in den drei Patientengruppen nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 9).

**Tabelle 8. Separationsergebnisse der ersten Leukapherese**

	<b>Mobilisation mit PEI</b> <b>(n=66)</b>	<b>Mobilisation mit TIP</b> <b>(n=26)</b>	<b>Mobilisation mit TI</b> <b>(n=28)</b>
MNC/kg ( $\times 10^8$ )	<b>2,1</b> (0,5-8,1)	<b>1,8</b> (0,8-3,5)	<b>2,2</b> (0,6-8,5)
CD34+ Zellen/kg ( $\times 10^6$ )	<b>3,0</b> (0,2-31,1)	<b>1,0</b> (0,2-7,7)	<b>2,9</b> (0,5-52,8)
CFU-GM/kg ( $\times 10^4$ )	<b>7,1</b> (0,4-62,0)	<b>6,7</b> (1,2-25,3)	<b>13,0</b> (2,5-69,4)

es sind jeweils Median und Range angegeben

**Tabelle 9. Separationsergebnisse der kumulativen Leukapheresen**

	<b>Mobilisation mit PEI (n=66)</b>	<b>Mobilisation mit TIP (n=26)</b>	<b>Mobilisation mit TI (n=28)</b>
MNC/kg ( $\times 10^8$ )	<b>3,9</b> (0,7-12,3)	<b>4,0</b> (1,2-9,2)	<b>2,6</b> (0,8-8,5)
CD34+ Zellen/kg ( $\times 10^6$ )	<b>7,1</b> (0,4-61,2)	<b>2,5</b> (1,1-7,7)	<b>3,6</b> (1,3-52,8)
CFU-GM/kg ( $\times 10^4$ )	<b>14,6</b> (2,7-70,7)	<b>15,4</b> (4,6-32,0)	<b>19,3</b> (3,5-69,4)

es sind jeweils Median und Range angegeben

### **3.1.6. Univariate Analyse prädiktiver Faktoren für die Mobilisation und Separation von CD34+ Zellen**

#### **3.1.6.1. Alter der Patienten**

Patienten, die 30 Jahre oder jünger waren (n=65) mobilisierten signifikant mehr CD34+ Zellen ins periphere Blut und sie hatten signifikant höhere Erträge an CD34+ Zellen sowohl bei der ersten als auch bei kumulativen Apheresen. Beide Gruppen waren hinsichtlich der G-CSF-Dosis und des Apherese-Blutvolumens vergleichbar (Tabelle 10).

#### **3.1.6.2. Zytostatische Vorbehandlung**

Patienten mit bis zu 6 Zyklen zytostatischer Vortherapie (n=54) hatten mehr CD34+ Zellen, sowohl in der Blutzirkulation als auch in den Apherese-Produkten, verglichen mit

Patienten, die mit mehr als 6 Zyklen vorbehandelt waren (n=64). Die G-CSF-Dosis, das Apheresevolumen und das Alter der Patienten war in beiden Gruppen vergleichbar (Tabelle 11).

**Tabelle 10. Einfluß des Patientenalters auf zirkulierende/gesammelte CD34+ Zellen**

	<b>Alter ≤30 Jahre</b>	<b>Alter &gt;30 Jahre</b>	<b>p-Wert Mann-Whitney Test</b>
Patienten (n=)	<b>65</b>	<b>55</b>	
Alter in Jahren Median (Range)	<b>26</b> (14-30)	<b>36</b> (31-58)	0,000
G-CSF-Dosis (µg/kg/Tag)	<b>5,8</b> (2,9-11,1)	<b>5,3</b> (3,0-12,0)	ns
Blutvolumen pro Leukapherese (l)	<b>11</b> (6-15)	<b>11</b> (7-15)	ns
CD34+ Zellen/µl (1. Apherese-Tag)	<b>46,9</b> (5,8-876,0)	<b>24,4</b> (3,6-668,6)	0,009
CD34+/kg (×10 <sup>6</sup> ) (1. Apherese)	<b>2,8</b> (0,5-52,8)	<b>1,9</b> (0,2-31,1)	0,015
CD34+/kg (×10 <sup>6</sup> ) (Apheresen total)	<b>4,8</b> (0,9-52,8)	<b>3,6</b> (0,4-61,2)	0,040

es sind jeweils Median und Range angegeben

ns: nicht signifikant

### 3.1.6.3. Kumulative Cisplatin-Dosis

Patienten, die in der Vorbehandlung eine kumulative Cisplatin-Dosis bis zu 500 mg/m<sup>2</sup>

erhalten haben (n=53), hatten am ersten Apherese-Tag mehr zirkulierende und gesammelte CD34+ Zellen als Patienten mit einer Cisplatin-Dosis >500 mg/m<sup>2</sup> (n=61). Alter, G-CSF-Dosis und Volumen des prozessierten Blutes pro Apherese waren in beiden Gruppen vergleichbar (Tabelle 12).

**Tabelle 11. Einfluß der zytostatischen Vortherapie auf zirkulierende/gesammelte CD34+ Zellen**

	<b>Chemotherapie ≤6 Zyklen</b>	<b>Chemotherapie &gt;6 Zyklen</b>	<b>p-Wert Mann-Whitney Test</b>
Patienten (n=)	<b>54</b>	<b>64</b>	
Alter in Jahren Median (Range)	<b>29</b> (20-53)	<b>30</b> (14-58)	ns
G-CSF-Dosis (µg/kg/Tag)	<b>5,3</b> (3,0-11,6)	<b>5,7</b> (2,9-12,0)	ns
Blutvolumen pro Leukapherese (l)	<b>11</b> (7-15)	<b>11</b> (6-15)	ns
CD34+ Zellen/µl (1. Apherese-Tag)	<b>65,5</b> (3,9-876,0)	<b>24,4</b> (3,6-200,7)	0,001
CD34+/kg (×10 <sup>6</sup> ) (1. Apherese)	<b>3,5</b> (0,3-52,8)	<b>2,0</b> (0,2-20,9)	0,002
CD34+/kg (×10 <sup>6</sup> ) (Apheresen total)	<b>5,2</b> (0,6-61,2)	<b>3,3</b> (0,4-35,6)	0,003

es sind jeweils Median und Range angegeben

ns: nicht signifikant

### 3.1.6.4. Kumulative Etoposid-Dosis

Patienten mit einer kumulativen Etoposid-Dosis  $\leq 2.500 \text{ mg/m}^2$  in der Vortherapie (n=63) hatten höhere CD34+ Zellzahlen, sowohl im peripheren Blut als auch in den Apherese-Produkten, als Patienten mit Etoposid  $> 2.500 \text{ mg/m}^2$  (n=53). Hinsichtlich des Alters der Patienten, der G-CSF-Dosis und des Blutvolumens der Apheresen waren beide Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 13).

**Tabelle 12. Einfluß der kumulativen Cisplatin-Dosis der Vortherapie auf zirkulierende/gesammelte CD34+ Zellen**

	<b>Cisplatin <math>\leq 500 \text{ mg/m}^2</math></b>	<b>Cisplatin <math>&gt; 500 \text{ mg/m}^2</math></b>	<b>p-Wert Mann-Whitney Test</b>
Patienten (n=)	<b>53</b>	<b>61</b>	
Alter in Jahren Median (Range)	<b>30</b> (20-53)	<b>30,5</b> (20-58)	ns
G-CSF-Dosis ( $\mu\text{g/kg/Tag}$ )	<b>6,1</b> (3,0-11,8)	<b>5,6</b> (2,9-12,0)	ns
Blutvolumen pro Leukapherese (l)	<b>11</b> (9-16)	<b>11</b> (7-16)	ns
CD34+ Zellen/ $\mu\text{l}$ (1. Apherese-Tag)	<b>65,5</b> (3,9-876,0)	<b>24,6</b> (3,6-200,7)	0,003
CD34+/ $\text{kg} (\times 10^6)$ (1. Apherese)	<b>3,3</b> (0,3-52,8)	<b>2,2</b> (0,2-20,9)	0,013
CD34+/ $\text{kg} (\times 10^6)$ (Apheresen total)	<b>4,8</b> (0,6-61,2)	<b>3,7</b> (0,4-35,6)	0.037

es sind jeweils Median und Range angegeben

ns: nicht signifikant

### 3.1.6.5. Kumulative Ifosfamid-Dosis

Patienten mit einer kumulativen Ifosfamid-Dosis  $\leq 24$  g/m<sup>2</sup> in der Vorbehandlung (n=48) hatten höhere periphere CD34+ Zellzahlen und mehr CD34+ Zellen in der ersten und den kumulativen Leukapheresen als Patienten mit Ifosfamid  $\geq 24$  g/m<sup>2</sup> (n=45). In beiden Gruppen waren Patientenalter, G-CSF-Dosis und prozessiertes Blutvolumen vergleichbar (Tabelle 14).

**Tabelle 13. Einfluß der kumulativen Etoposid-Dosis der Vortherapie auf zirkulierende/gesammelte CD34+ Zellen**

	<b>Etoposid <math>\leq 2.500</math> mg/m<sup>2</sup></b>	<b>Etoposid &gt;2.500 mg/m<sup>2</sup></b>	<b>p-Wert Mann-Whitney Test</b>
Patienten (n=)	<b>63</b>	<b>53</b>	
Alter in Jahren Median (Range)	<b>30</b> (20-53)	<b>30</b> (19-58)	ns
G-CSF-Dosis ( $\mu$ g/kg/Tag)	<b>5,2</b> (3,0-11,8)	<b>5,8</b> (2,9-12,0)	ns
Blutvolumen pro Leukapherese (l)	<b>11</b> (8-16)	<b>11</b> (7-15)	ns
CD34+ Zellen/ $\mu$ l (1. Apherese-Tag)	<b>55,1</b> (3,6-876,0)	<b>24,2</b> (3,7-159,1)	0,002
CD34+/kg ( $\times 10^6$ ) (1. Apherese)	<b>3,2</b> (0,2-52,8)	<b>2,0</b> (0,2-20,9)	0,005
CD34+/kg ( $\times 10^6$ ) (Apheresen total)	<b>5,3</b> (0,4-61,2)	<b>3,6</b> (0,9-35,6)	0,011

es sind jeweils Median und Range angegeben

ns: nicht signifikant

### 3.1.6.6. Mobilisationschemotherapie

Die drei Chemotherapieregime, die zur Mobilisation der peripheren Blutstammzellen eingesetzt wurden, hatten sowohl auf zirkulierende als auch gesammelte CD34+ Zellen signifikante Auswirkung. Der Vergleich im Kruskal-Wallis Test ergab statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 15).

**Tabelle 14. Einfluß der kumulativen Ifosfamid-Dosis der Vortherapie auf zirkulierende/gesammelte CD34+ Zellen**

	<b>Ifosfamid ≤24 g/m<sup>2</sup></b>	<b>Ifosfamid &gt;24 g/m<sup>2</sup></b>	<b>p-Wert Mann-Whitney Test</b>
Patienten (n=)	<b>48</b>	<b>45</b>	
Alter in Jahren Median (Range)	<b>30</b> (20-49)	<b>31</b> (19-49)	ns
G-CSF-Dosis (µg/kg/Tag)	<b>5,1</b> (2,9-11,8)	<b>5,6</b> (3,0-12,0)	ns
Blutvolumen pro Leukapherese (l)	<b>11</b> (8-15)	<b>11</b> (7-16)	ns
CD34+ Zellen/µl (1. Apherese-Tag)	<b>59,7</b> (3,9-650,0)	<b>23,8</b> (4,4-200,7)	0,002
CD34+/kg (×10 <sup>6</sup> ) (1. Apherese)	<b>3,0</b> (0,2-52,8)	<b>1,8</b> (0,2-13,9)	0,010
CD34+/kg (×10 <sup>6</sup> ) (Apheresen total)	<b>5,2</b> (0,4-52,8)	<b>3,6</b> (0,9-25,6)	0,014

es sind jeweils Median und Range angegeben

ns: nicht signifikant

**Tabelle 15. Einfluß der Mobilisationschemotherapie auf zirkulierende/gesammelte CD34+ Zellen**

	<b>PEI- Mobilisation (n=66)</b>	<b>TIP- Mobilisation (n=26)</b>	<b>TI-Mobilisation (n=28)</b>	<b>Kruskal- Wallis*</b>
CD34+ Zellen/ $\mu$ l (1. Apherese-Tag)	<b>43,4</b> (3,6-668,6)	<b>15,2</b> (3,7-130,9)	<b>60,5</b> (6,6-876,0)	0,000
CD34+/kg ( $\times 10^6$ ) (1. Apherese)	<b>3,0</b> (0,2-31,1)	<b>1,0</b> (0,2-7,7)	<b>2,9</b> (0,5-52,8)	0,000
CD34+/kg ( $\times 10^6$ ) (Apheresen total)	<b>7,1</b> (0,4-61,2)	<b>2,5</b> (1,1-7,7)	<b>3,6</b> (1,3-52,8)	0,000

es sind jeweils Median und Range angegeben

\*es sind die jeweiligen p-Werte angegeben

Der Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander wurde im Mann-Whitney Test geprüft. PEI- und TI-Patienten hatten am ersten Apherese-Tag signifikant mehr zirkulierende CD34+ Zellen als TIP-Patienten und sie hatten auch einen signifikant höheren Ertrag an CD34+ Zellen bei der ersten und den kumulativen Leukapheresen. Der Vergleich von PEI- und TI-Patienten ergab am ersten Apherese-Tag für zirkulierende und gesammelte CD34+ Zellen keine signifikanten Unterschiede, lediglich das kumulative Sammelergebnis war bei Patienten, die PEI als Mobilisierungs-chemotherapie erhalten hatten, signifikant höher (Tabelle 16).

**Tabelle 16. Einfluß der Mobilisationschemotherapie auf zirkulierende/gesammelte CD34+ Zellen**

	<b>PEI- Mobilisation (n=66)</b>	<b>TIP- Mobilisation (n=26)</b>	<b>TI- Mobilisation (n=28)</b>	<b>Mann- Whitney*</b>
CD34+ Zellen/ $\mu$ l (1. Apherese-Tag)	<b>43,4</b> (3,6-668,6)	<b>15,2</b> (3,7-130,9)		0,001
CD34+ Zellen/ $\mu$ l (1. Apherese-Tag)	<b>43,4</b> (3,6-668,6)		<b>60,5</b> (6,6-876,0)	ns
CD34+ Zellen/ $\mu$ l (1. Apherese-Tag)		<b>15,2</b> (3,7-130,9)	<b>60,5</b> (6,6-876,0)	0,000
CD34+/kg ( $\times 10^6$ ) (1. Apherese)	<b>3,0</b> (0,2-31,1)	<b>1,0</b> (0,2-7,7)		0,000
CD34+/kg ( $\times 10^6$ ) (1. Apherese)	<b>3,0</b> (0,2-31,1)		<b>2,9</b> (0,5-52,8)	ns
CD34+/kg ( $\times 10^6$ ) (1. Apherese)		<b>1,0</b> (0,2-7,7)	<b>2,9</b> (0,5-52,8)	0,000
CD34+/kg ( $\times 10^6$ ) (Apheresen total)	<b>7,1</b> (0,4-61,2)	<b>2,5</b> (1,1-7,7)		0,000
CD34+/kg ( $\times 10^6$ ) (Apheresen total)	<b>7,1</b> (0,4-61,2)		<b>3,6</b> (1,3-52,8)	0,039
CD34+/kg ( $\times 10^6$ ) (Apheresen total)		<b>2,5</b> (1,1-7,7)	<b>3,6</b> (1,3-52,8)	0,027

es sind jeweils Median und Range angegeben

\*es sind die jeweiligen p-Werte angegeben

ns: nicht signifikant

### **3.1.7. Andere Parameter**

Die Lokalisation des Primärtumors, die Histologie, das Stadium der Erkrankung und die Höhe der Tumormarker (AFP, HCG) bei Erstdiagnose, die Dauer der Primärtherapie, die kumulative Bleomycin-Dosis der Ersttherapie, die Zeit zwischen Primärtherapie und Mobilisationschemotherapie, das Krankheitsstadium und die Höhe von AFP und HCG vor Mobilisationschemotherapie, sowie das Ansprechen auf die "salvage" Chemo-therapie spielten für die Mobilisation und Separation der CD34+ Zellen keine signifikante Rolle.

### **3.1.8. Multivariate Analyse prädiktiver Faktoren für die Mobilisation und Separation von CD34+ Zellen**

Die in der univariaten Analyse statistisch signifikanten Faktoren für die Mobilisation und Separation von CD34+ Zellen wurden in eine Multivarianzanalyse (multiple lineare Regression) eingebracht um ihren prädiktiven Wert statistisch zu untermauern. In der multiplen linearen Regression wurden die kumulativen Dosen von Cisplatin und Etoposid, die in der univariaten Analyse signifikant prädiktiv waren, sowohl für zirkulierende als auch für gesammelte CD34+ Zellen eliminiert. Die kumulative Ifosfamid-Dosis, die in der univariaten Analyse für periphere und separierte CD34+ Zellen signifikant war, wurde in der multiplen linearen Regression für separierte CD34+ Zellen eliminiert, blieb jedoch für zirkulierende CD34+ Zellen statistisch signifikant. Somit verblieben nach der Multivarianzanalyse als voneinander unabhängige, signifikant prädiktive Faktoren für die Mobilisation und Separation von CD34+ Zellen folgende Parameter: Alter des Patienten, Anzahl der Chemotherapiezyklen während der Vortherapie und die Mobilisationsregime PEI und TI (Tabelle 17, Tabelle 18).

**Tabelle 17. Gegenüberstellung der uni- und multivariaten Analyse für prädiktive Faktoren für zirkulierende CD34+ Zellen**

	Prädiktion für zirkulierende CD34+ Zellen/ $\mu$ l am 1. Leukapherese-Tag	
<b>Gruppenvariablen</b>	<b>Univariate Analyse*</b> <b>p-Wert</b>	<b>Multivariate Analyse**</b> <b>p-Wert</b>
Alter $\leq 30$ Jahre $> 30$ Jahre	0,015	0,002
Vorthherapie $\leq 6$ Zyklen $> 6$ Zyklen	0,001	0,003
Cisplatin-Dosis $\leq 500$ mg/m <sup>2</sup> $> 500$ mg/m <sup>2</sup>	0,003	ns
Etoposid-Dosis $\leq 2.500$ mg/m <sup>2</sup> $> 2.500$ mg/m <sup>2</sup>	0,002	ns
Ifosfamid-Dosis $\leq 24$ g/m <sup>2</sup> $> 24$ g/m <sup>2</sup>	0,002	0,039
Mobilisationschemotherapie PEI versus TIP	0,001	–
Mobilisationschemotherapie TI versus TIP	0,000	–
Mobilisationschemotherapie PEI/TI versus TIP	–	0,034

\*Mann-Whitney Test

\*\*Multiple lineare Regression

ns: nicht signifikant

**Tabelle 18. Gegenüberstellung der uni- und multivariaten Analyse für prädiktive Faktoren für gesammelte CD34+ Zellen**

	Prädiktion für gesammelte CD34+ Zellen/kg (1. Leukapherese)	
Gruppenvariablen	Univariate Analyse*	Multivariate Analyse**
Alter ≤ 30 Jahre > 30 Jahre	0,015	0,008
Vortherapie ≤ 6 Zyklen > 6 Zyklen	0,002	0,005
Cisplatin-Dosis ≤ 500 mg/m <sup>2</sup> > 500 mg/m <sup>2</sup>	0,013	ns
Etoposid-Dosis ≤ 2.500 mg/m <sup>2</sup> > 2.500 mg/m <sup>2</sup>	0,005	ns
Ifosfamid-Dosis ≤ 24 g/m <sup>2</sup> > 24 g/m <sup>2</sup>	0,010	ns
Mobilisationschemotherapie PEI versus TIP	0,001	–
Mobilisationschemotherapie TI versus TIP	0,000	–
Mobilisationschemotherapie PEI/TI versus TIP	–	0,007

\*Mann-Whitney Test

\*\*Multiple lineare Regression

ns: nicht signifikant

### 3.1.9. Korrelationsanalyse zur Definition prädiktiver Parameter des Blutbilds für zirkulierende CD34+ Zellen und gesammelte CFU-GM und CD34+ Zellen

Um an den Tagen der Leukapheresen die Zahl der peripher zirkulierenden CD34+ Zellen und die gesammelte Menge an CFU-GM und CD34+ Zellen abschätzen zu können, wurde die prädiktive Wertigkeit von Blutbildparameter, gemessen am Tag der jeweiligen Apherese, mit Hilfe der Spearman'Korrelation analysiert.

#### 3.1.9.1. Zirkulierende CD34+ Zellen

Die Zahl der Leukozyten und Thrombozyten korrelierte nicht mit den CD34+ Zellen des peripheren Blutes. Die MNC korrelierten mit einem Spearman'Koeffizienten von 0,44 mäßig mit den zirkulierenden CD34+ Zellen (Tabelle 19).

**Tabelle 19. Prädiktiver Wert des Blutbilds für zirkulierende CD34+ Zellen**

	<b>Zirkulierende CD34+ Zellen/<math>\mu</math>l im peripheren Blut am ersten Leukapherese-Tag</b>	
<b>Peripheres Blut</b>	<b>Korrelationskoeffizient*</b>	<b>Signifikanz-Niveau**</b>
Leukozyten/ $\mu$ l	0,01	ns
MNC/ $\mu$ l	0,44	0,001
Thrombozyten/ $\mu$ l	0,14	ns

\*r-Wert nach Spearman

\*\*p-Wert

ns: nicht signifikant

### 3.1.9.2. Separation von CFU-GM

Leukozyten, MNC und CD34+ Zellen des peripheren Blutes korrelierten mäßig mit dem Ertrag an CFU-GM, der während der ersten Leukapheresen gewonnen wurde. Zwischen Thrombozytenzahlen und separierten CFU-GM bestand keine Korrelation (Tabelle 20).

**Tabelle 20. Prädiktiver Wert des Blutbilds für gesammelte CFU-GM**

Peripheres Blut	Gesammelte CFU-GM/kg (1. Leukapherese)	
	Korrelations-Koeffizient*	Signifikanz-Niveau**
Leukozyten/ $\mu$ l	0,31	0,001
MNC/ $\mu$ l	0,51	0,001
Thrombozyten/ $\mu$ l	0,19	ns
CD34+ Zellen/ $\mu$ l	0,54	0,001

\*r-Wert nach Spearman

\*\*p-Wert

ns: nicht signifikant

### 3.1.9.3. Separation von CD34+ Zellen

Leukozyten und Thrombozyten des peripheren Blutes korrelierten nicht mit den gesammelten CD34+ Zellen der ersten Apherese. Eine mäßige Korrelation zeigten MNC des peripheren Blutes mit dem Sammelergebnis der CD34+ Zellen. Zirkulierende CD34+ Zellen/ $\mu$ l korrelierten mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,96 hoch signifikant mit gesammelten CD34+ Zellen/kg (Tabelle 21).

Tabelle 21. Prädiktiver Wert des Blutbilds für gesammelte CD34+ Zellen

	Gesammelte CD34+ Zellen/kg (1. Leukapherese)	
Peripheres Blut	Korrelations-Koeffizient*	Signifikanz-Niveau**
Leukozyten/ $\mu$ l	0,01	ns
MNC/ $\mu$ l	0,36	0,001
Thrombozyten/ $\mu$ l	0,01	ns
CD34+ Zellen/ $\mu$ l	0,96	0,000

\*r-Wert nach Spearman

\*\*p-Wert

ns: nicht signifikant

Die statistisch hoch signifikante Korrelation zwischen CD34+ Zellen/ $\mu$ l, gemessen im peripheren Blut des Patienten vor Beginn der Leukapherese, und gesammelten CD34+ Zellen/kg im Apherese-Produkt ist in Abbildung 8 dargestellt ( $r=0,96$ ;  $p=0,000$ ). Die Korrelationsanalyse beruht auf gepaarten Werten erhoben bei 228 Leukapheresen, die bei 111 Patienten durchgeführt worden sind. Für eine bessere Übersicht sind die Daten von vier Patienten mit einer Zahl zirkulierender CD34+ Zellen  $>320/\mu$ l nicht dargestellt (Abbildung 8).

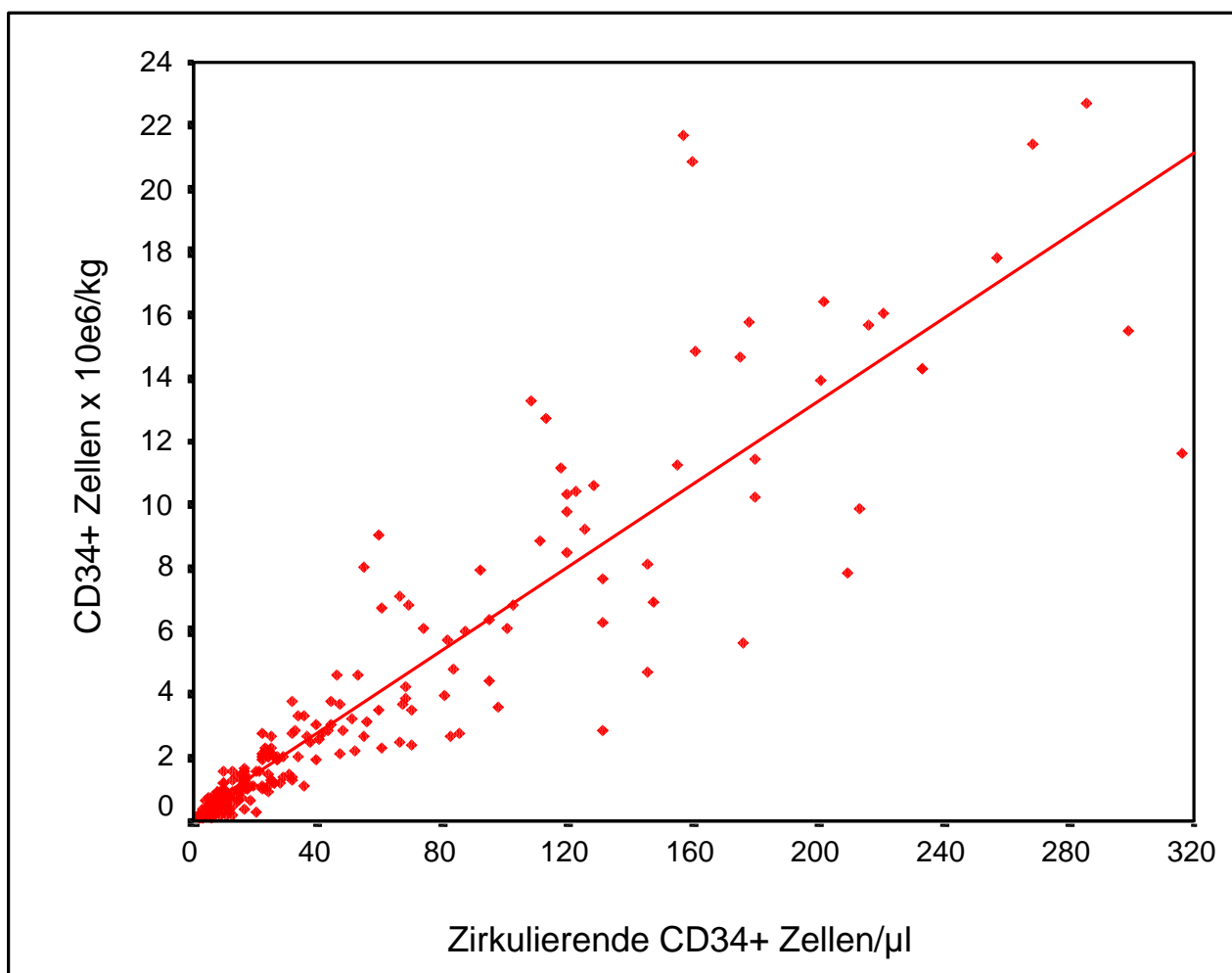


Abbildung 8. Korrelation zwischen zirkulierenden und gesammelten CD34+ Zellen

In Abbildung 9 ist die Korrelationsanalyse für die erste Leukapherese der 111 Patienten dargestellt. Anhand der peripheren CD34+ Zellen, gemessen am Tag der ersten Apherese, kann das Ergebnis der Leukapherese mit großer Wahrscheinlichkeit vorausgesagt werden ( $r=0,96$ ;  $p=0,000$ ). Aus der Abbildung geht eindeutig hervor, daß bei einer Zahl zirkulierender CD34+ Zellen  $>40/\mu\text{l}$  mit der ersten 11-I-Leukapherese mehr als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen pro kg Körpergewicht eines Patienten gesammelt werden können. Diese Beobachtung ist deshalb von Bedeutung, weil die Reinfusion eines autologen Blutstammzelltransplantats mit mehr als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg zu einer schnellen Regeneration der Hämatopoese nach Hochdosistherapie führt (107-111).

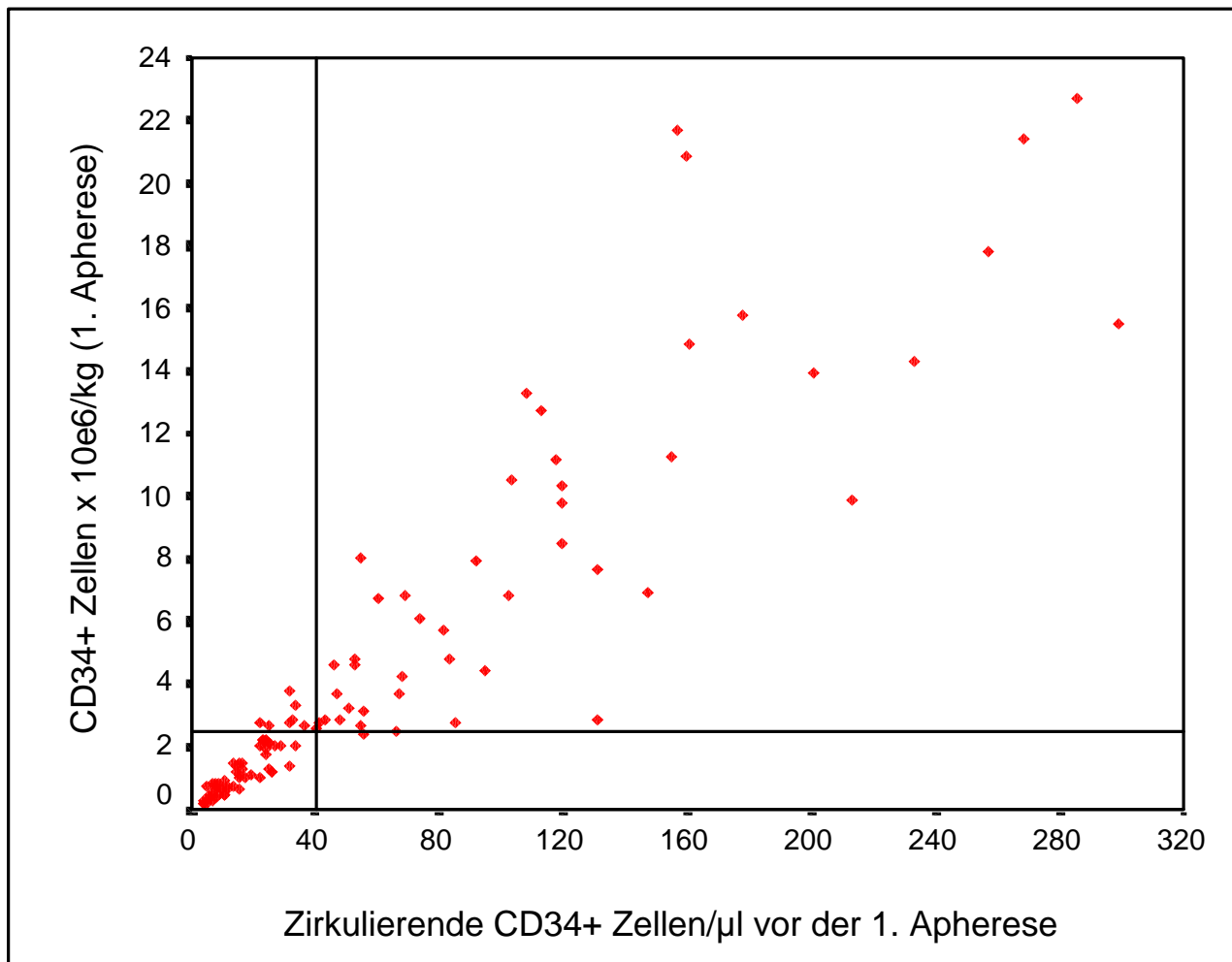


Abbildung 9. Prädiktion der gesammelten CD34+ Zellen/kg bei einer Zahl zirkulierender CD34+ Zellen  $>40/\mu\text{l}$  am ersten Leukapheresetag

Wird eine Dosis größer als  $5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg angestrebt, so muß am Tag der Apherese die Zahl der zirkulierenden CD34+ Zellen mehr als  $100/\mu\text{l}$  betragen, um mit einer einzigen 11-l-Apherese die angestrebte Zelldosis zu erreichen (Abbildung 10).

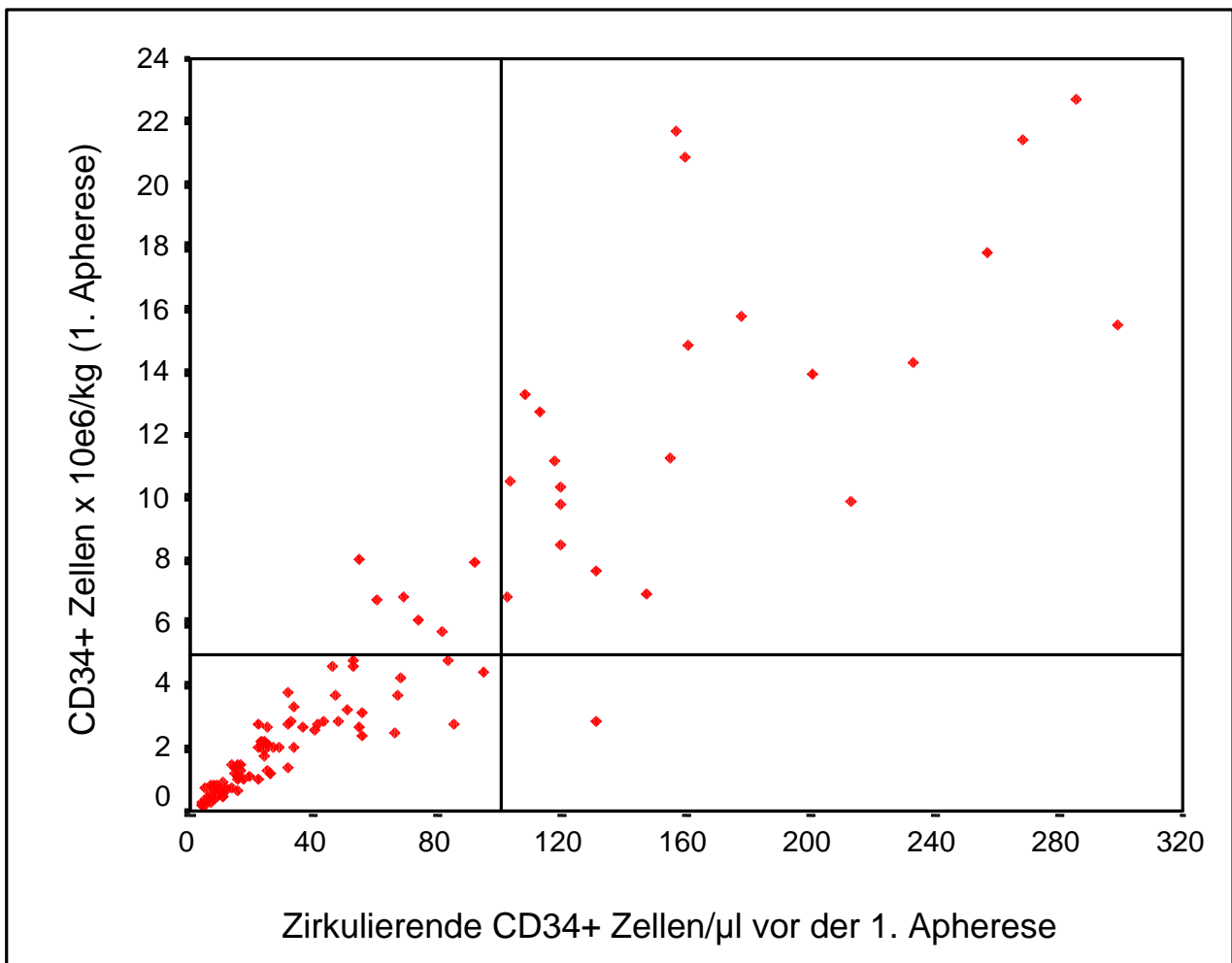


Abbildung 10. Prädiktion der gesammelten CD34+ Zellen/kg bei einer Zahl zirkulierender CD34+ Zellen  $>100/\mu\text{l}$  am ersten Leukapheresetag

Werden die Apheresen bei CD34+ Zellzahlen  $<40/\mu\text{l}$  durchgeführt, dann sind mehrere Leukapheresen nötig, um mehr als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg sammeln zu können. Liegt die Zahl der zirkulierenden CD34+ Zellen zwischen 20 und  $40/\mu\text{l}$ , so kann mit einer Leukapherese eine Zelldosis  $>1,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg mit hoher Wahrscheinlichkeit gesammelt werden (Abbildung 11).

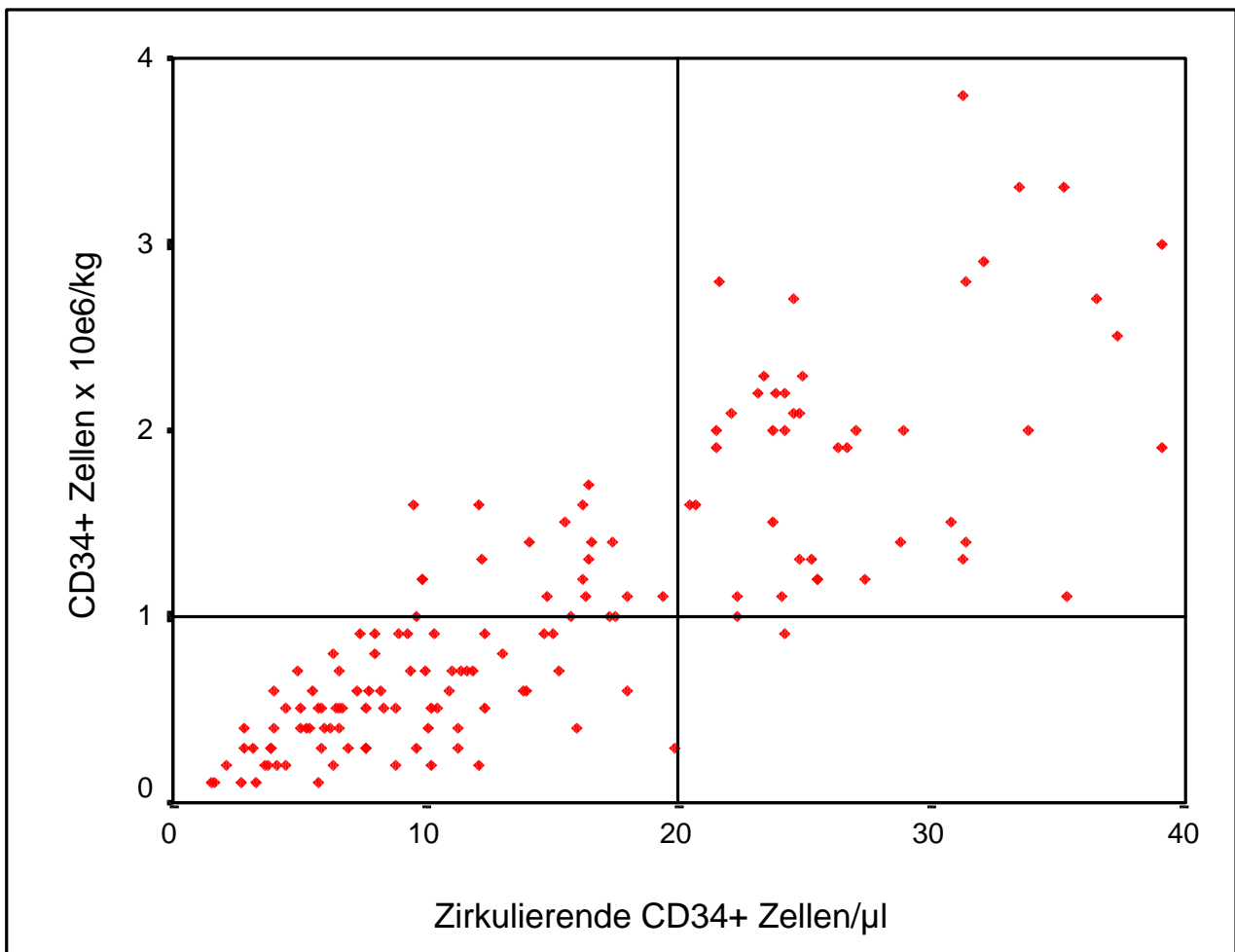


Abbildung 11. Prädiktion der gesammelten CD34+ Zellen/kg bei einer Zahl zirkulierender CD34+ Zellen 20-40/μl

Werden die Separationen bei peripheren Werten zwischen 10 und 20 CD34+ Zellen/μl durchgeführt, so streuen die Erträge der Apheresen von  $0,2$  bis  $1,7 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg. Hierbei bleibt aber das Sammelergebnis auf jeden Fall deutlich unter  $2,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (Abbildung 12).

Bei zirkulierenden CD34+ Zellen  $\leq 10/\mu\text{l}$ , also bei Patienten die wenig Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut mobilisieren, liegt der Ertrag einer 11-I-Leukapherese fast ausnahmslos unter  $1,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (Abbildung 12).

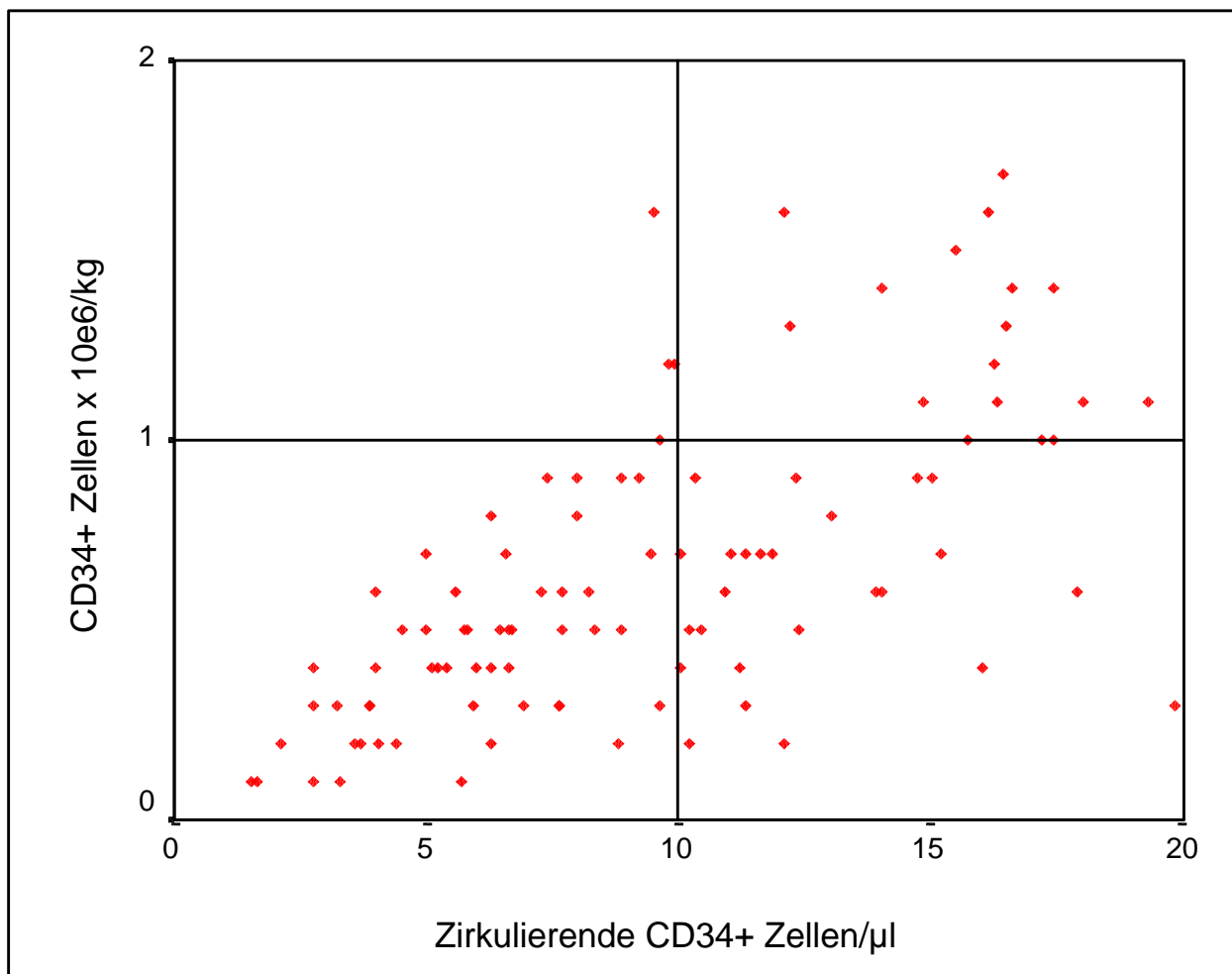


Abbildung 12. Prädiktion der gesammelten CD34+ Zellen/kg bei einer Zahl zirkulierender CD34+ Zellen  $<20/\mu$ l

In Tabelle 22 sind 111 Patienten nach der Zahl zirkulierender CD34+ Zellen am ersten Apherese-Tag in Gruppen eingeteilt. Die Dosis der gewonnenen CD34+ Zellen steigt mit der Höhe der zirkulierenden CD34+ Zellen von der niedrigeren Gruppe zur nächsten höheren Gruppe. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen in Bezug auf die gesammelten CD34+ Zellen/kg eines Patienten sind im Mann-Whitney Test ausnahmslos statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Insgesamt hatten 51 Patienten (46%) bei der ersten Leukapherese mehr als 40 CD34+ Zellen/ $\mu$ l. Bei 50 Patienten konnte mit einer einzigen 11-l-Apherese eine Zelldosis  $\geq 2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg gewonnen werden. Lediglich ein

Patient verfehlte mit  $2,4 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg den erwarteten Aphereseertrag knapp. Achtundzwanzig Patienten (25%) hatten mehr als 100 CD34+ Zellen/ $\mu$ l vor der ersten Sammlung, ein Wert ab dem man mit einem Sammelergebnis  $\geq 5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg rechnen kann. In der Tat konnte bei 27 Patienten diese Zelldosis durch eine 11-l-Leukapherese erreicht werden. Ein Patient lag allerdings mit  $2,9 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg deutlich unter dem prognostizierten Aphereseergebnis. Achtzehn Patienten (16%) mobilisierten weniger als 10 CD34+ Zellen/ $\mu$ l und brauchten bis zu sieben Separationen, um ein hämatopoetisches Transplantat zu erhalten. Die restlichen 42 Patienten (38%) hatten 10-40 CD34+ Zellen/ $\mu$ l und hatten median zwei Leukapheresen (Tabelle 22).

**Tabelle 22. Einfluß der zirkulierenden CD34+ Zellen auf den Ertrag der ersten Leukapherese**

Zirkulierende CD34+ Zellen/ $\mu$ l	Patienten (n=111)	Gesammelte CD34+ Zellen $\cdot 10^6$ /kg (1. Leukapherese)	
		Median	Range
£ 10	18 (16,2%)	0,5	0,2-0,8
> 10 £ 20	17 (15,3%)	1,0	0,5-1,5
> 20 £ 30	17 (15,3%)	2,0	1,0-2,8
> 30 £ 40	8 (7,2%)	2,8	1,4-3,8
> 40 £ 100	23 (20,7%)	4,2	2,4-8,0
> 100	28 (25,2%)	14,1	2,9-52,8

### 3.1.10. Hochdosischemotherapie und Transplantation autologer Blutstammzellen

Von 120 Patienten mit kryokonservierten Blutstammzellen erhielten 101 Patienten eine Hochdosischemotherapie. Für die Analyse der hämatopoetischen Rekonstitution und des Verlaufs nach autologer Transplantation waren 96 Patienten auswertbar. Vier Patienten wurden von der Analyse der Posttransplantationsphase ausgeschlossen, weil sie innerhalb von zwei Wochen am Multiorganversagen verstarben. Ein weiterer Patient, bei dem die gewonnenen Stammzellen zur CD34-Selektion einer ex vivo Manipulation unterzogen wurden, wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit ausgeschlossen, da alle Patienten unmanipulierte Transplantate erhalten haben (Tabelle 23).

**Tabelle 23. Hochdosischemotherapie und autologe Transplantation**

	<b>PEI- Mobilisation Hochdosis-CEI#</b>	<b>TIP- Mobilisation Hochdosis-CET</b>	<b>TI-Mobilisation Hochdosis-CET</b>	<b>Patienten Gesamt</b>
Patienten (n=)	66	26	28	120
Transplantierte Patienten	57	23	21	101
Patienten als Frühtodesfall	2	0	2	4
Patienten nicht auswertbar*	0	1	0	1
Auswertbare Patienten	55	22	19	96

CEI: Carboplatin, Etoposid, Ifosfamid

CET: Carboplatin, Etoposid, Thiotepa

#Cyclophosphamid statt Ifosfamid in 3 Fällen

\*Ex vivo Manipulation des Transplantats

### 3.1.10.1. Transplantierte Zelldosis

Sechshundneunzig Patienten erhielten nach der Hochdosismethotherapie im Median  $3,6 \times 10^8$  MNC/kg (0,8-12,3),  $4,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (0,4-61,2) und  $15,7 \times 10^4$  CFU-GM/kg (2,7-70,7). Die Verteilung der transplantierten Zelldosis in den drei Untergruppen ist in Tabelle 26 dargestellt. Hierbei erhielten PEI- und TIP-Patienten signifikant mehr MNC/kg als TI-Patienten ( $p=0,007$ ;  $p=0,011$ ). PEI-Patienten hatten die höchste Menge an CD34+ Zellen/kg, gefolgt von TI- und TIP-Patienten, wobei die Unterschiede zwischen PEI- und TIP-Patienten sowie TI- und TIP-Patienten statistisch signifikant waren ( $p=0,002$ ;  $p=0,023$ ). Die Menge der reinfundierten CD34+ Zellen/kg war zwischen PEI- und TI-Patienten nicht signifikant unterschiedlich. Hinsichtlich der transplantierten CFU-GM-Dosis waren die drei Gruppen vergleichbar (Tabelle 24).

**Tabelle 24. Transplantierte Zelldosis nach Hochdosistherapie**

	<b>PEI-CEI (n=55)</b>	<b>TIP-CET (n=22)</b>	<b>TI-CET (n=19)</b>	<b>Alle Patienten (n=96)</b>
MNC/kg ( $\times 10^8$ )	<b>3,9</b> (1,6-12,3)	<b>4,4</b> (1,2-9,2)	<b>2,6</b> (0,8-5,4)	<b>3,6</b> (0,8-12,3)
CD34+ Zellen/kg ( $\times 10^6$ )	<b>5,8</b> (0,4-61,2)	<b>2,8</b> (1,1-7,7)	<b>4,0</b> (1,3-21,7)	<b>4,0</b> (0,4-61,2)
CFU-GM/kg ( $\times 10^4$ )	<b>14,6</b> (2,7-70,7)	<b>15,4</b> (4,6-32,0)	<b>19,3</b> (3,5-69,4)	<b>15,7</b> (2,7-70,7)

es sind jeweils Median und Range angegeben

### 3.1.10.2. Hämatopoetische Rekonstitution

#### 3.1.10.2.1. Gesamtkollektiv

Sechsendneunzig Patienten erreichten Leukozyten  $>1.000/\mu\text{l}$  und Granulozyten  $>500/\mu\text{l}$  in einem medianen Zeitraum von 10 (7-27) bzw. 10 Tagen (8-27). Ein Patient mit  $0,6 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg benötigte 27 Tage, ein anderer Patient mit  $1,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg 20 Tage für die Regeneration der Granulozyten. Alle weiteren Patienten erreichten Granulozyten  $>500/\mu\text{l}$  innerhalb von 14 Tagen (Abbildung 13).

Thrombozyten  $>20.000/\mu\text{l}$  wurden im Median in 12 Tagen (7-202) erreicht. Ein Patient mit einer Dosis von  $1,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg benötigte zur Thrombozyten-Rekonstitution 202 Tage. Die anderen Patienten erreichten Thrombozyten  $>20.000/\mu\text{l}$  innerhalb von 41 Tagen (Abbildung 14).

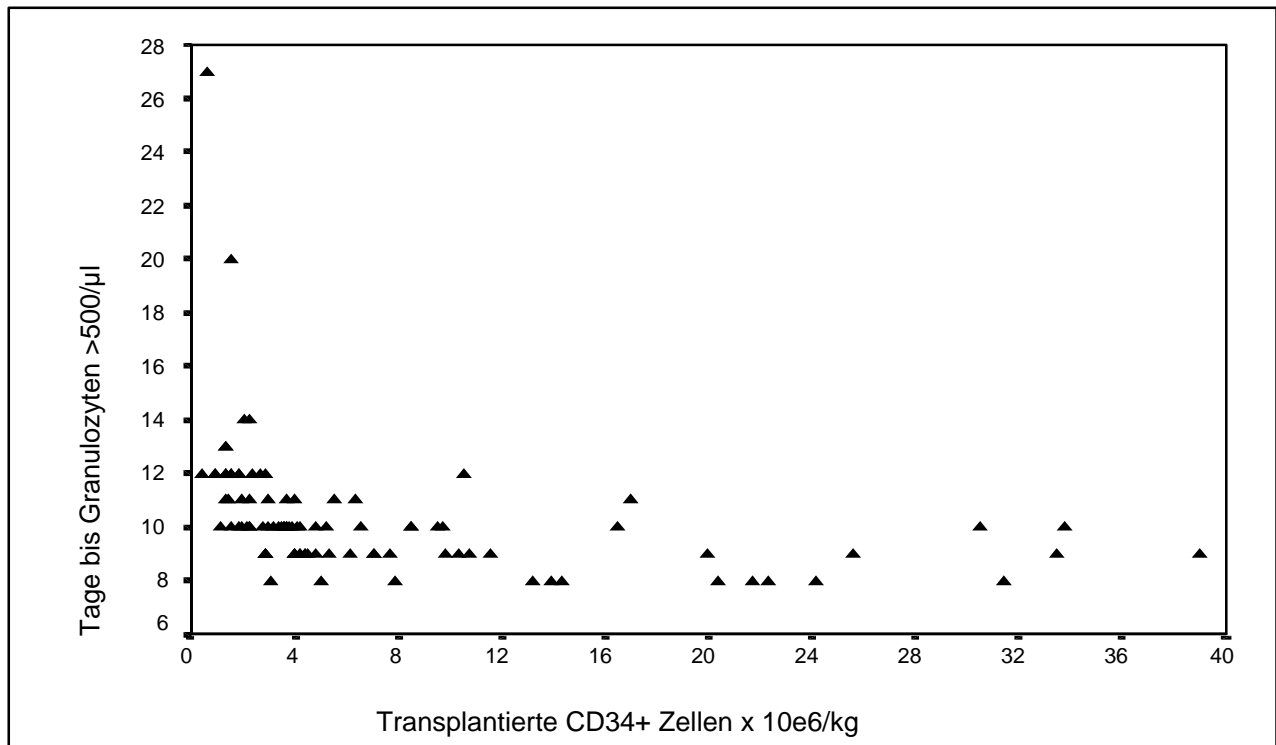
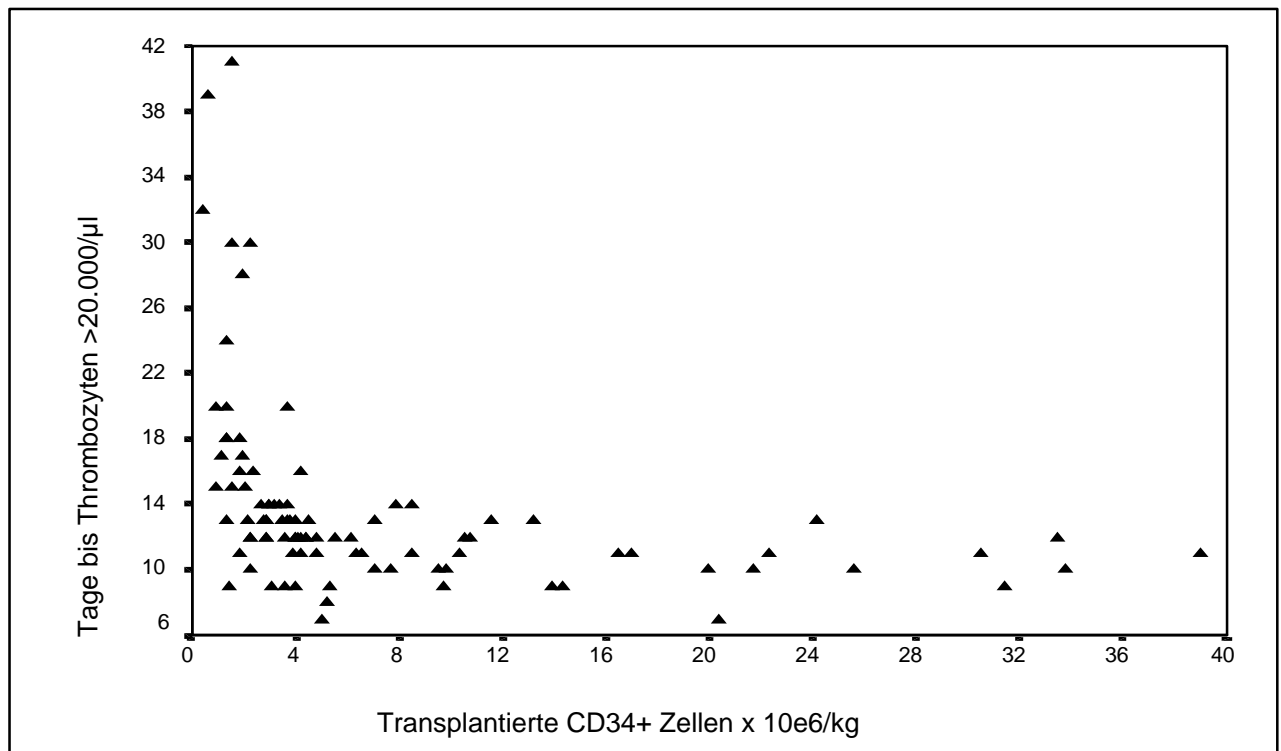


Abbildung 13. Rekonstitution der Granulozyten im Gesamtkollektiv



**Abbildung 14. Rekonstitution der Thrombozyten im Gesamtkollektiv**

### 3.1.10.2.2. Patienten mit PEI-Mobilisation und Hochdosis-CEI

Patienten (n=55) erreichten Leukozyten  $>1.000/\mu\text{l}$  im Median in 10 Tagen (7-27) sowie Granulozyten  $>500/\mu\text{l}$  in 10 Tagen (8-27). Ein Patient mit der Zelldosis von  $0,6 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg benötigte mit 27 Tagen bis zur Regeneration der Granulozyten erheblich länger als die anderen Patienten, die hierfür 8 bis 14 Tage brauchten (Abbildung 15). Die Regeneration der Thrombozyten  $>20.000/\mu\text{l}$  wurde median in 11 Tagen, jedoch spätestens am Tag 39 erreicht (Abbildung 16).

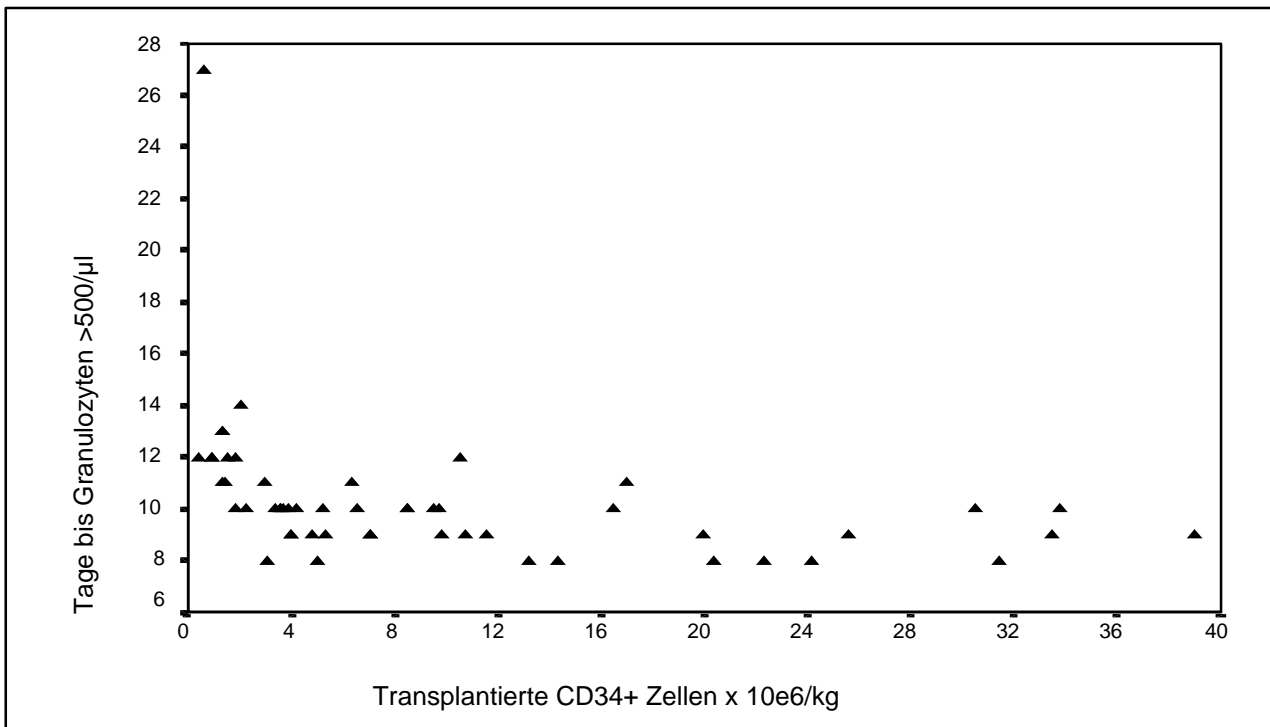


Abbildung 15. Rekonstitution der Granulozyten bei PEI-Patienten

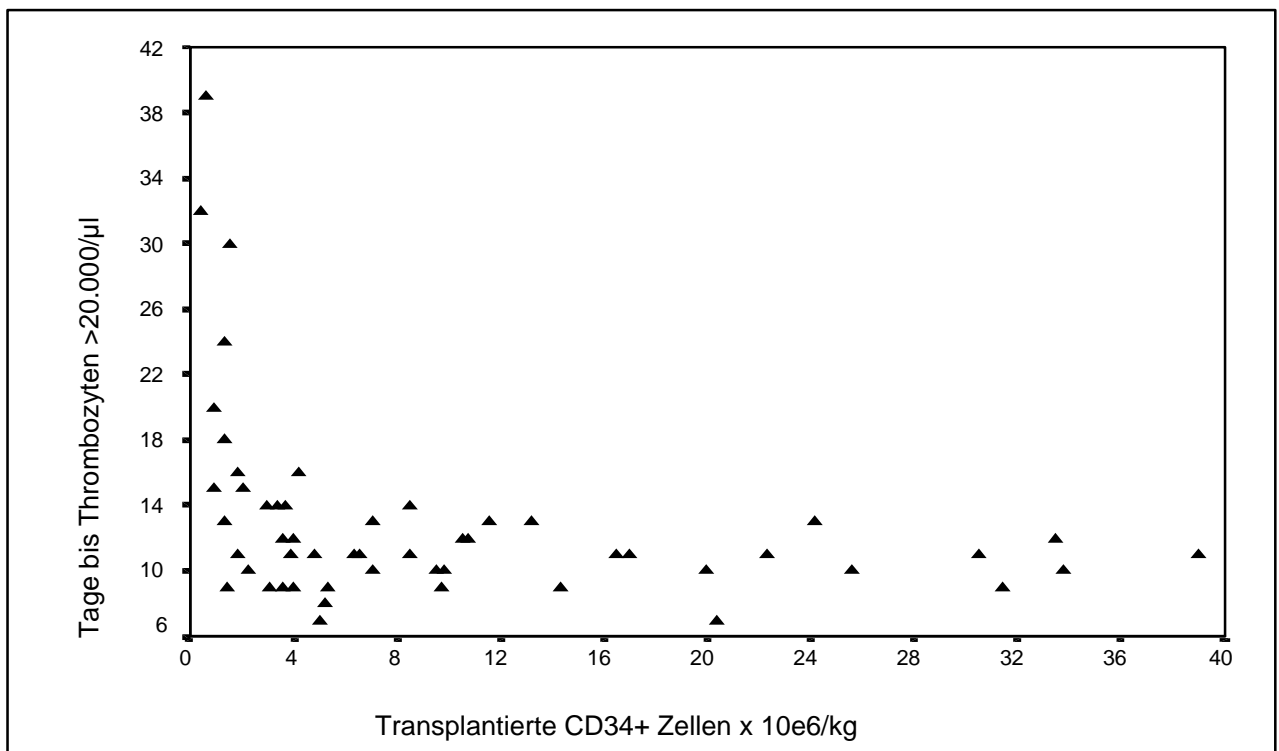


Abbildung 16. Rekonstitution der Thrombozyten bei PEI-Patienten

### 3.1.10.2.3. Patienten mit TIP-Mobilisation und Hochdosis-CET

TIP-Patienten (n=22) erreichten Leukozyten  $>1.000/\mu\text{l}$  median in 10 Tagen (9-20) und Granulozyten  $>500/\mu\text{l}$  in 10 Tagen (9-20). Ein Patient brauchte 20 Tage bis zur Erholung der Granulopoese, alle anderen erreichten Granulozyten  $>500/\mu\text{l}$  in 9 bis 14 Tagen (Abbildung 17).

Thrombozyten  $>20.000/\mu\text{l}$  wurden erstmals im Median am Tag 13 (10-202) gezählt. Neunzehn Patienten konnten die Thrombopoese in 10 bis 18 Tagen rekonstituieren. Ein Patient benötigte hierfür 30 Tage, ein anderer 41 Tage (Abbildung 18). Ein Patient mit der Zelldosis von  $1,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg brauchte hierfür 202 Tage. Dieser Patient ist in Abbildung 18 aus Gründen der Übersicht nicht dargestellt.

### 3.1.10.2.4. Patienten mit TI-Mobilisation und Hochdosis-CET

Alle TI-Patienten (n=19) erreichten Leukozyten  $>1.000/\mu\text{l}$  median in 10 Tagen (8-12) und Granulozyten  $>500/\mu\text{l}$  in 9 Tagen (8-12) (Abbildung 19).

Die Rekonstitution der Thrombozyten  $>20.000/\mu\text{l}$  erfolgte im Median nach 12,5 Tagen (9-28). Ein Patient benötigte hierfür mit 28 Tagen erheblich länger als die anderen Patienten, die Thrombozyten  $>20.000/\mu\text{l}$  in 9 bis 20 Tagen regenerieren konnten (Abbildung 20).

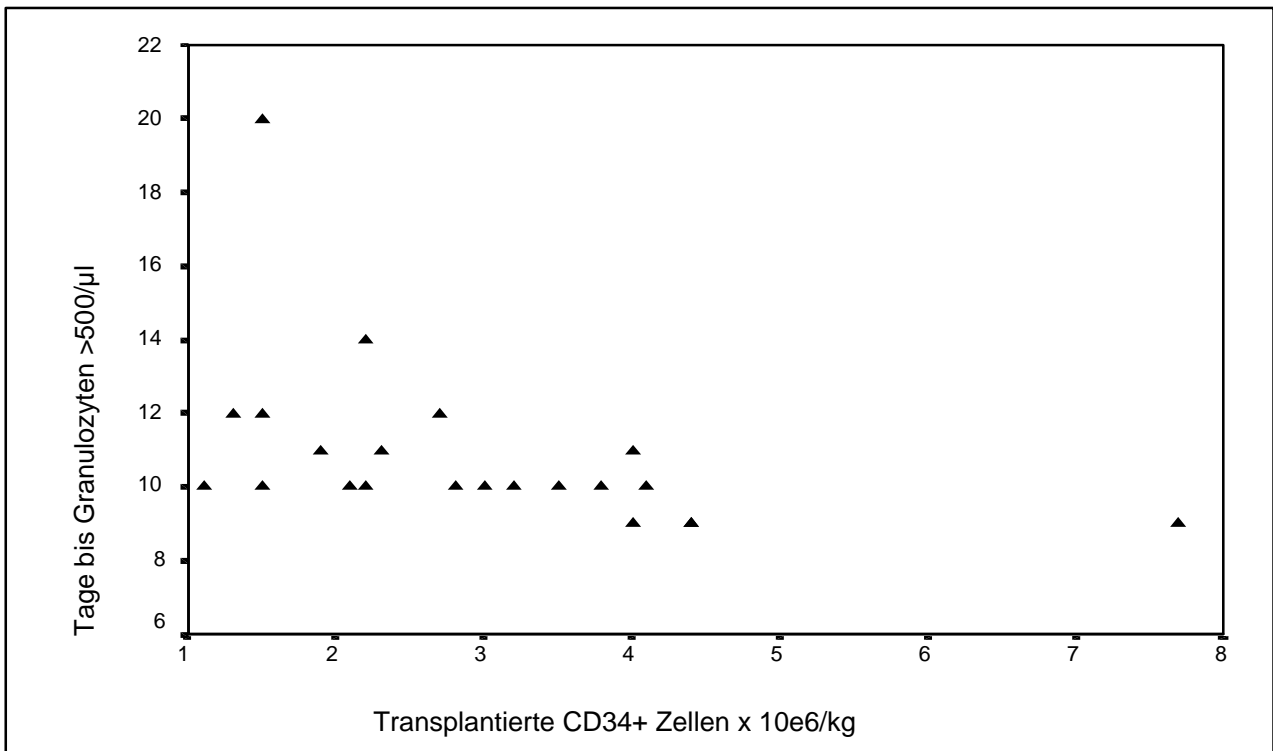


Abbildung 17. Rekonstitution der Granulozyten bei TIP-Patienten

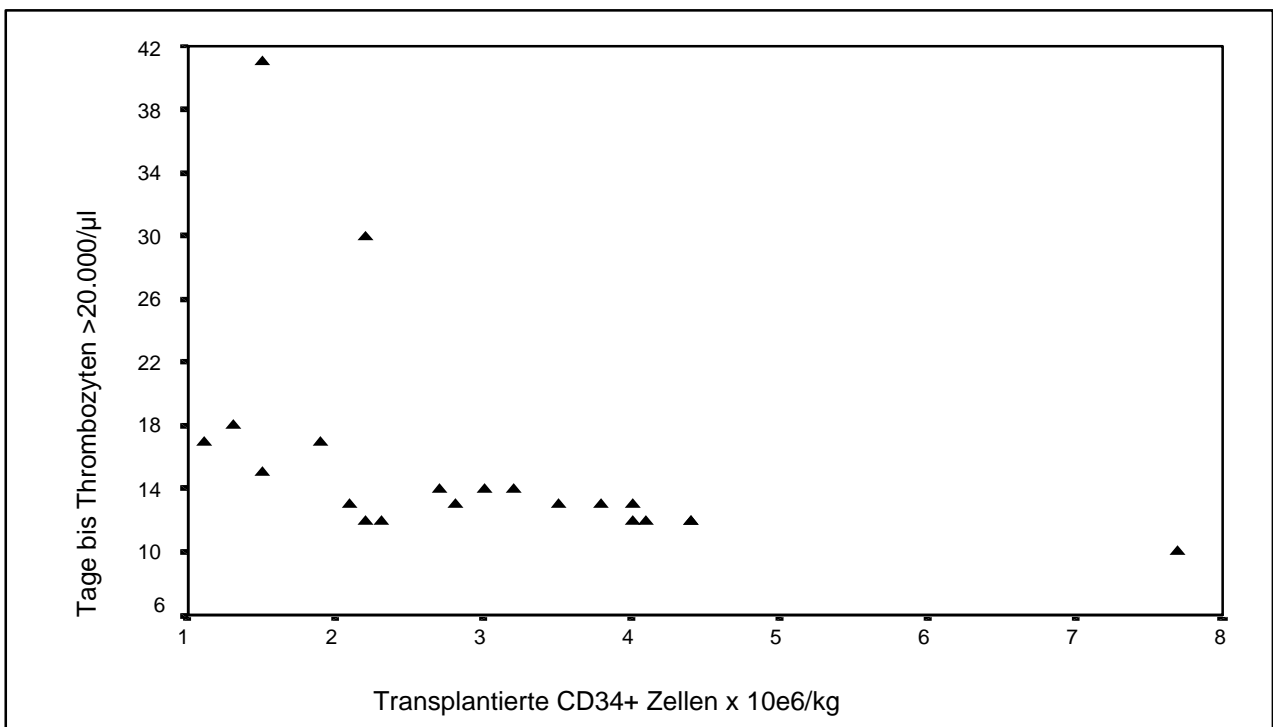


Abbildung 18. Rekonstitution der Thrombozyten bei TIP-Patienten

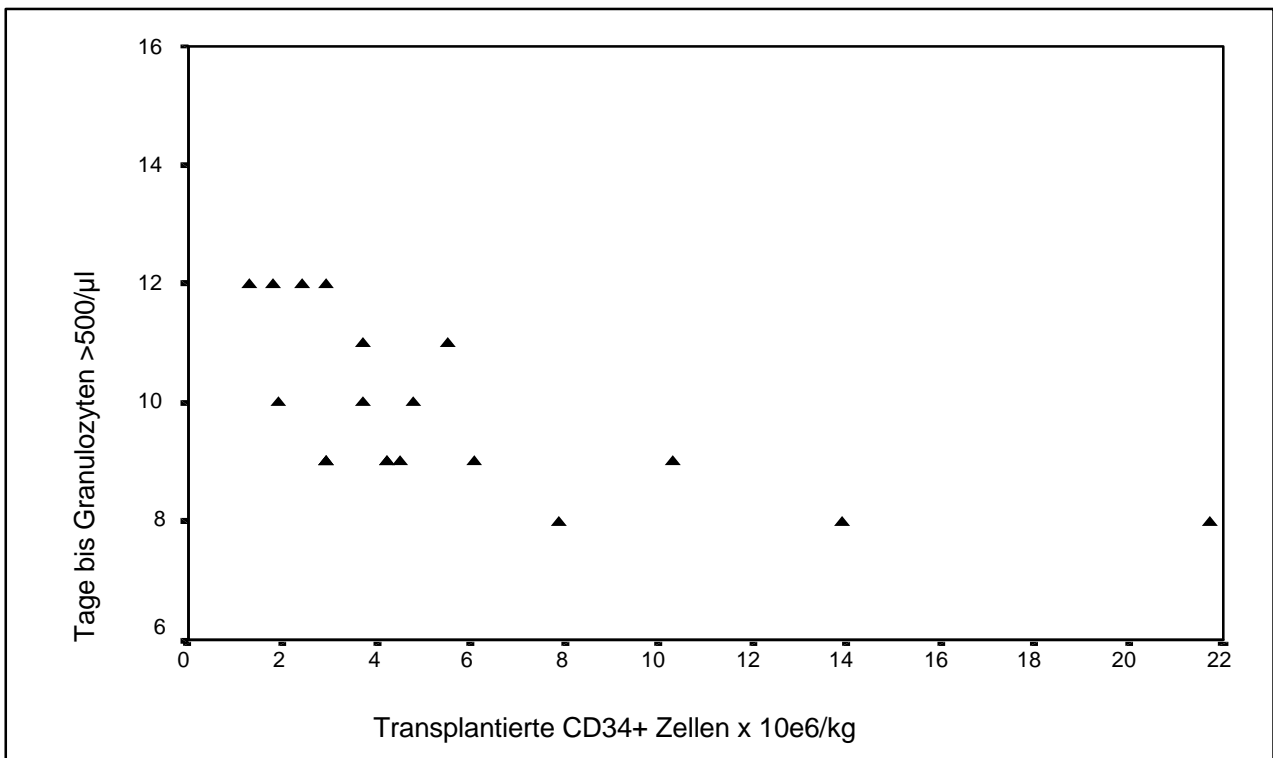


Abbildung 19. Rekonstitution der Granulozyten bei TI-Patienten

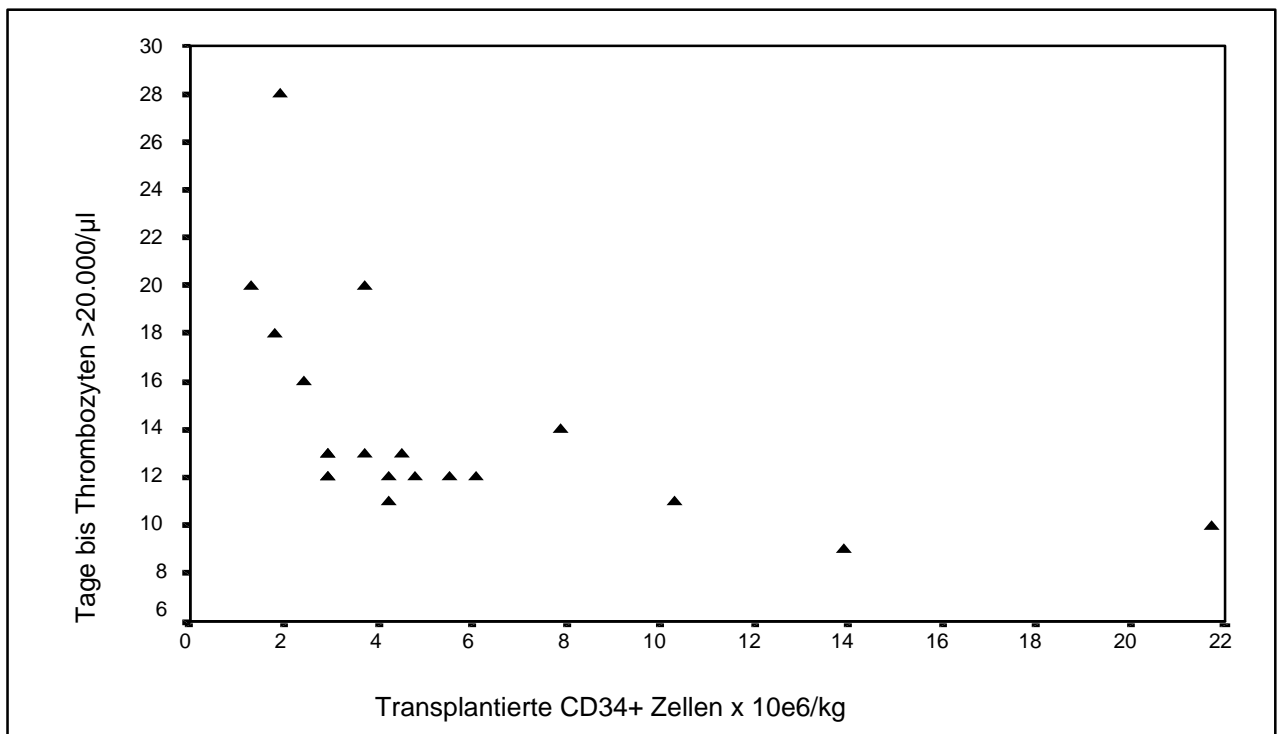


Abbildung 20. Rekonstitution der Thrombozyten bei TI-Patienten

### 3.1.10.2.5. Vergleich der Hämatopoese nach Transplantation einer Zelldosis $\geq 2,5 \cdot 10^6$ oder $< 2,5 \cdot 10^6$ CD34+ Zellen/kg

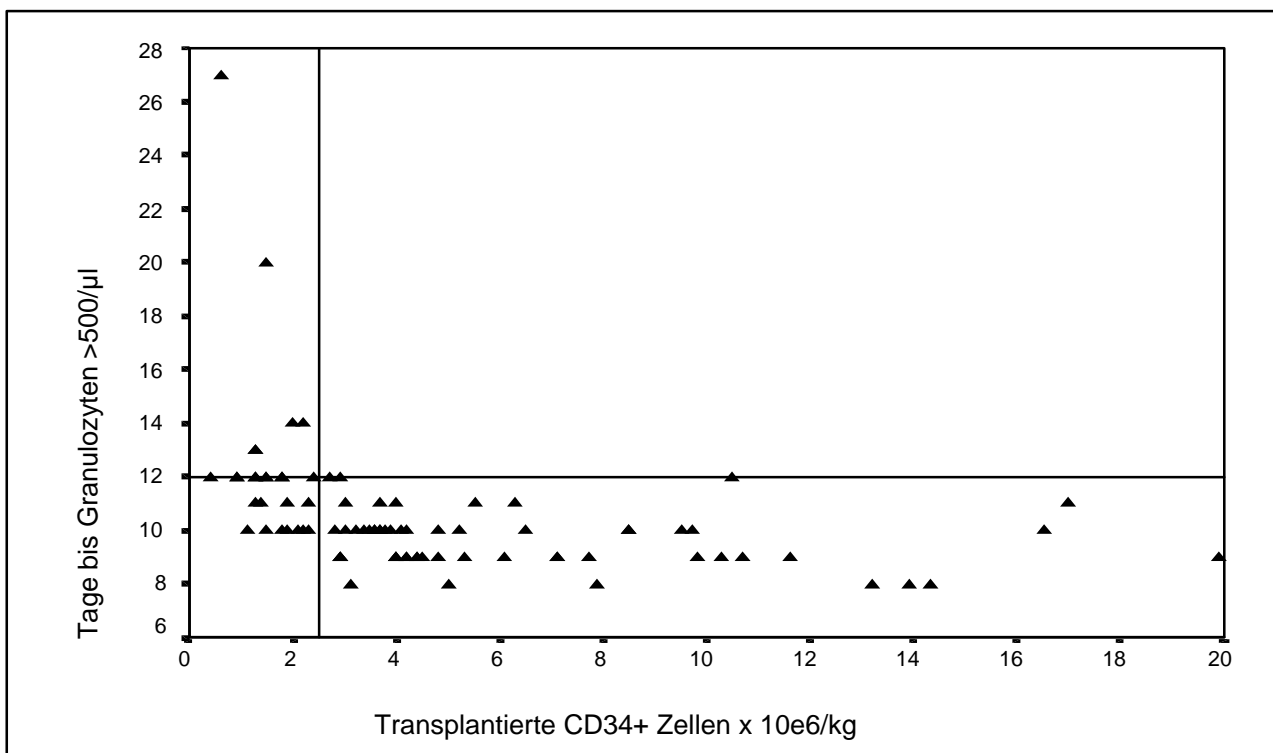
Eigene präliminäre Daten und Beobachtungen anderer Untersucher erlauben die Schlußfolgerung, daß für eine schnelle Regeneration der autologen Hämatopoese die Reinfusion einer Zelldosis von  $2,0-2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg benötigt wird (108-111). Basierend auf diesen Erkenntnissen führten wir einen Vergleich zur hämatopoetischen Rekonstitution bei transplantierten Patienten durch, die mehr oder weniger als eine Zelldosis von  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg erhalten hatten. Patienten mit mehr als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (n=69) erreichten die Regeneration der Hämatopoese in einer signifikant kürzeren Zeit als Patienten mit weniger als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (n=27): 9 (7-12) versus 12 (9-27) Tage für Leukozyten  $>1.000/\mu\text{l}$ , 9 (8-12) versus 12 Tage (10-27) für Granulozyten  $>500/\mu\text{l}$  und 12 (7-20) versus 17 (9-202) Tage für Thrombozyten  $>20.000/\mu\text{l}$  (Tabelle 25).

**Tabelle 25. Hämatopoetische Rekonstitution nach Hochdosischemotherapie**

	CD34+ Zellen/kg $\geq 2,5 \cdot 10^6$	CD34+ Zellen/kg $< 2,5 \cdot 10^6$	p-Wert Mann-Whitney Test
Patienten (n=)	<b>69</b>	<b>27</b>	
Tage bis Leukozyten $>1.000/\mu\text{l}$	<b>9</b> (7-12)	<b>12</b> (9-27)	0,000
Tage bis Granulozyten $>500/\mu\text{l}$	<b>9</b> (8-12)	<b>12</b> (10-27)	0,000
Tage bis Thrombozyten $>20.000/\mu\text{l}$	<b>12</b> (7-20)	<b>17</b> (9-202)	0,000

es sind jeweils Median und Range angegeben

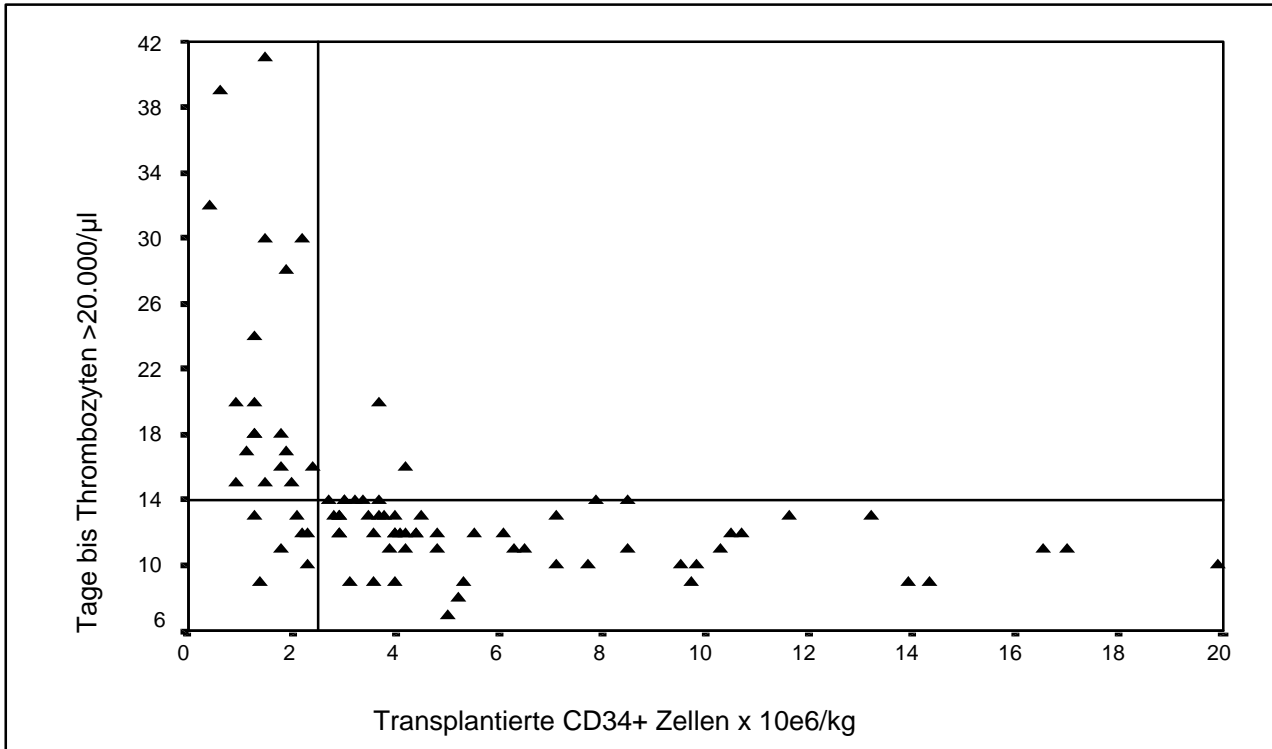
Abbildung 21 zeigt die Regeneration der Granulozyten nach Hochdosischemotherapie. Alle Patienten, die mehr als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg bekamen, erreichten ohne Ausnahme Granulozyten  $>500/\mu\text{l}$  innerhalb von 8 bis 12 Tagen. Die meisten Patienten mit weniger als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg brauchten hierfür 10 bis 14 Tage, wobei zwei Patienten mit 20 und 27 Tagen einen erheblich längeren Zeitraum benötigten um mehr als 500 Granulozyten/ $\mu\text{l}$  aufzuweisen (Abbildung 21).



**Abbildung 21. Rekonstitution der Granulozyten im Gesamtkollektiv**

In Abbildung 22 ist die Rekonstitution der Thrombozyten nach Hochdosischemotherapie dargestellt. Patienten mit mehr als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg erreichten, bis auf zwei Ausnahmen, in 7 bis 14 Tagen Thrombozyten  $>20.000/\mu\text{l}$ . Ein Patient brauchte 16 Tage und ein weiterer Patient 20 Tage. Von den Patienten, die weniger als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg erhalten haben, benötigten die meisten länger als 14 Tage bis zu einer Thrombozytenzahl  $>20.000/\mu\text{l}$  (Abbildung 22). Acht Patienten (30%) brauchten länger als 21 Tage. Ein Patient, der bis zur Rekonstitution der Thrombopoese 202 Tage benötigte,

ist in der Abbildung nicht berücksichtigt.



**Abbildung 22. Rekonstitution der Thrombozyten im Gesamtkollektiv**

### 3.1.10.2.6. Univariate Analyse (log rank Test) prädiktiver Faktoren für die hämatopoetische Rekonstitution nach Hochdosischemotherapie

Die Erholung der Hämatopoese nach Hochdosischemotherapie wurde statistisch signifikant beeinflusst von der transplantierten Zelldosis der CD34+ Zellen/kg und der CFU-GM/kg (log rank Test).

Bei der Dosis der übertragenen CD34+ Zellen/kg ließen sich drei Patientengruppen identifizieren:

1.  $<2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (n=27)
2.  $\geq 2,5 \times 10^6 \leq 5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (n=33)

3.  $>5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (n=36)

Für die Menge der reinfundierten CFU-GM/kg waren ebenfalls drei Gruppen voneinander abgrenzbar:

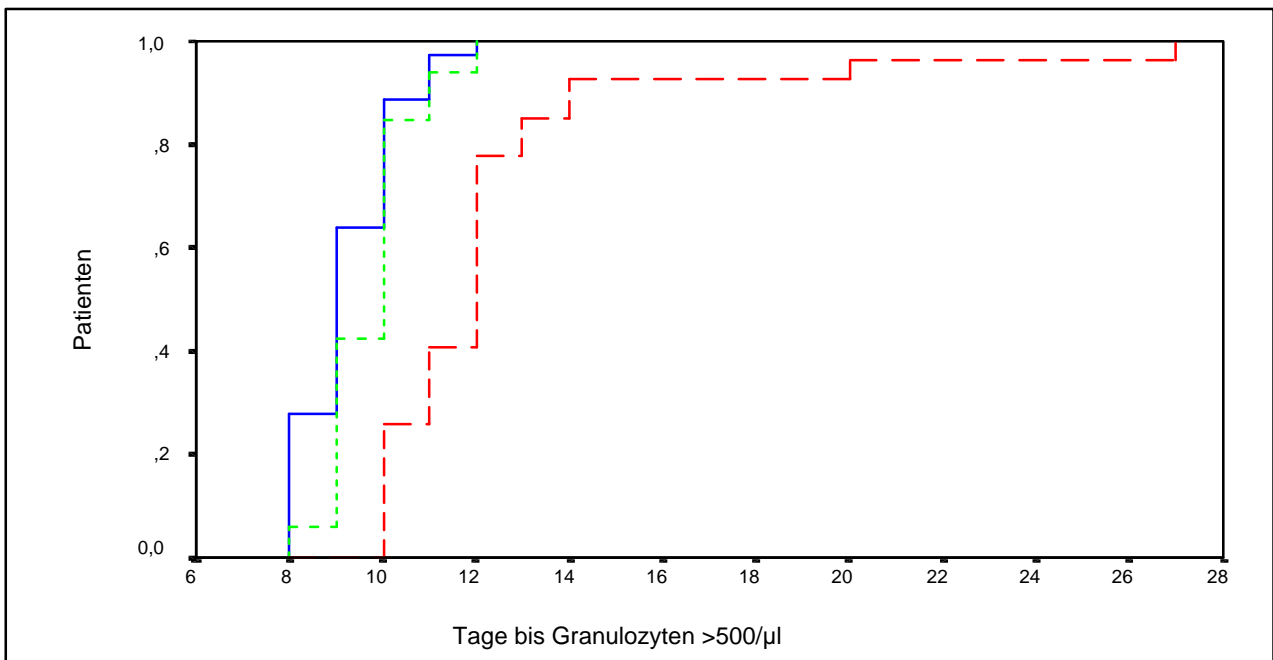
1.  $<10 \times 10^4$  CFU-GM/kg (n=24)

2.  $\geq 10 \times 10^4 \leq 20 \times 10^4$  CFU-GM/kg (n=37)

3.  $>20 \times 10^4$  CFU-GM/kg (n=30)

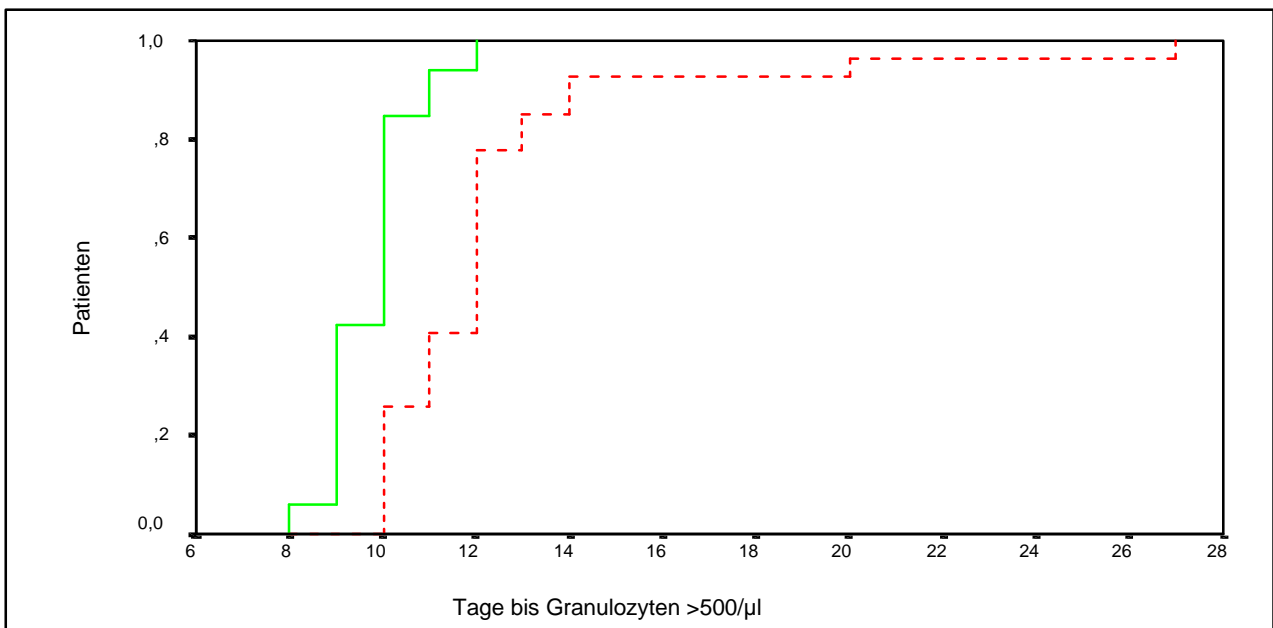
### **3.1.10.2.6.1. CD34+ Zellen und Regeneration der Granulozyten**

Die Regeneration der Granulozyten in den drei Patientengruppen mit unterschiedlicher CD34+ Zelldosis ist in der Abbildung 23 dargestellt. Patienten mit  $<2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg benötigten signifikant länger um Granulozyten  $>500/\mu\text{l}$  zu erreichen als Patienten mit  $\geq 2,5 \times 10^6 \leq 5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg oder mit  $>5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (Tabelle 26, Abbildung 24, Abbildung 25). Die Erholung der Granulopoese war zwischen Patienten mit einer Zelldosis  $\geq 2,5 \times 10^6 \leq 5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg und Patienten mit  $>5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg statistisch nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 26, Abbildung 26).



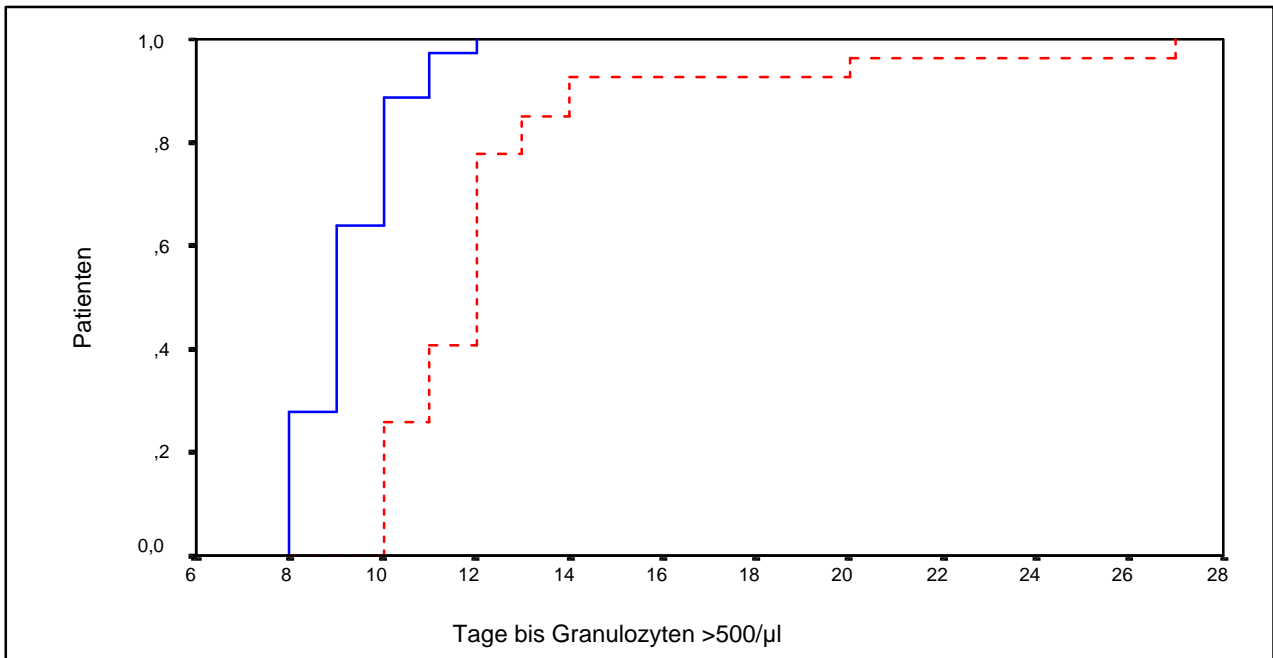
CD34+ Zellen/kg:  $>5 \times 10^6$ : durchgehende Linie;  $\geq 2,5 \leq 5 \times 10^6$ : fein gestrichelt;  $< 2,5 \times 10^6$ : grob gestrichelt

**Abbildung 23. Regeneration der Granulozyten in Abhängigkeit von der Dosis der transplantierten CD34+ Zellen/kg**



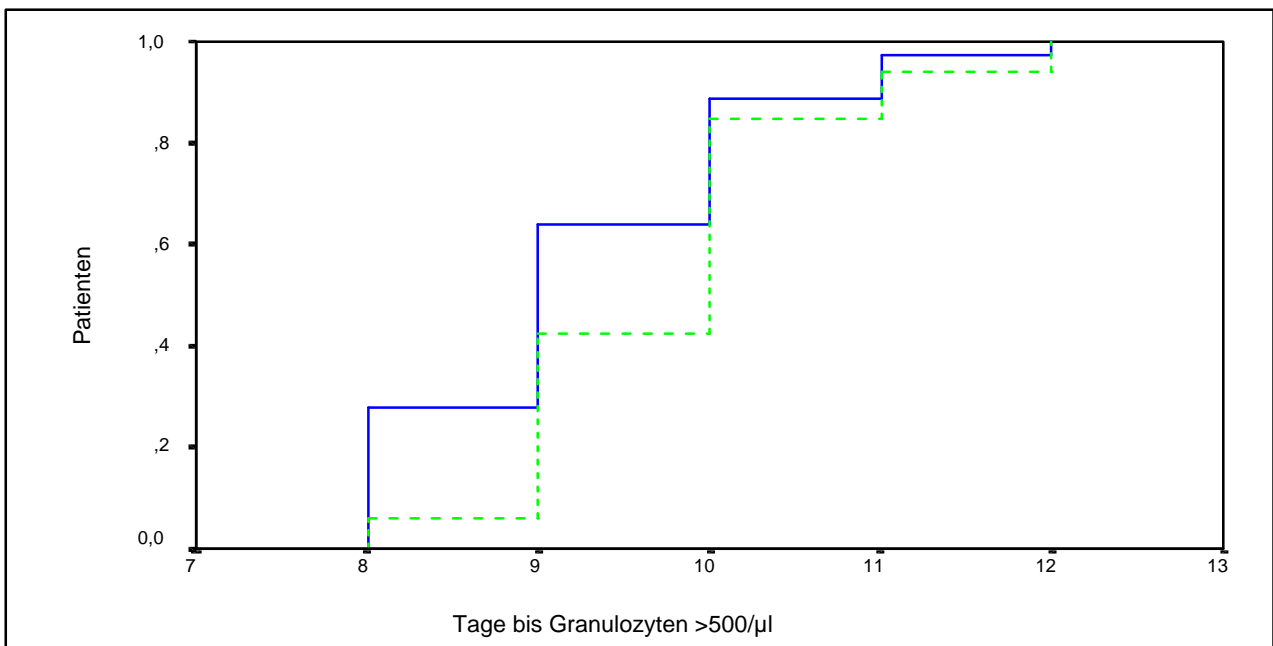
CD34+ Zellen/kg:  $\geq 2,5 \leq 5 \times 10^6$ : durchgehende Linie;  $< 2,5 \times 10^6$ : fein gestrichelt

**Abbildung 24. Regeneration der Granulozyten in Abhängigkeit von der Dosis der transplantierten CD34+ Zellen/kg**



CD34+ Zellen/kg:  $>5 \times 10^6$ : durchgehende Linie;  $<2,5 \times 10^6$ : fein gestrichelt

**Abbildung 25. Regeneration der Granulozyten in Abhängigkeit von der Dosis der transplantierten CD34+ Zellen/kg**



CD34+ Zellen/kg:  $>5 \times 10^6$ : durchgehende Linie;  $\geq 2,5 \leq 5 \times 10^6$ : fein gestrichelt

**Abbildung 26. Regeneration der Granulozyten in Abhängigkeit von der Dosis der transplantierten CD34+ Zellen/kg**

**Tabelle 26. Einfluß der transplantierten CD34+ Zellen/kg auf die Regeneration der Granulozyten nach Hochdosischemotherapie**

Tage bis Erreichen von Granulozyten >500/ $\mu$ l			Log rank Test
CD34+ Zellen/kg <2,5 $\cdot$ 10 <sup>6</sup>	CD34+ Zellen/kg $\approx$ 2,5 $\cdot$ 10 <sup>6</sup> –5,0 $\cdot$ 10 <sup>6</sup>	CD34+ Zellen/kg >5,0 $\cdot$ 10 <sup>6</sup>	p-Wert
12 (10-27)	10 (8-12)	9 (8-12)	0,000
12 (10-27)	10 (8-12)		0,000
12 (10-27)		9 (8-12)	0,000
	10 (8-12)	9 (8-12)	ns

es sind jeweils Median und Range angegeben

ns: nicht signifikant

### 3.1.10.2.6.2. CFU-GM und Regeneration der Granulozyten

Patienten mit einer transplantierten Zelldosis <10 $\times$ 10<sup>4</sup> CFU-GM/kg hatten eine signifikant längere Regenerationsphase als Patienten mit  $\geq$ 10 $\times$ 10<sup>4</sup>–20 $\times$ 10<sup>4</sup> CFU-GM/kg oder mit >20 $\times$ 10<sup>4</sup> CFU-GM/kg (p=0,05; p=0,002). Die Rekonstitution der Granulozytopoese war zwischen Patienten mit einer Zelldosis  $\geq$ 10 $\times$ 10<sup>4</sup>–20 $\times$ 10<sup>4</sup> CFU-GM/kg und Patienten mit >20 $\times$ 10<sup>4</sup> CFU-GM/kg nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 27).

**Tabelle 27. Einfluß der transplantierten CFU-GM/kg auf die Regeneration der Granulozyten nach Hochdosischemotherapie**

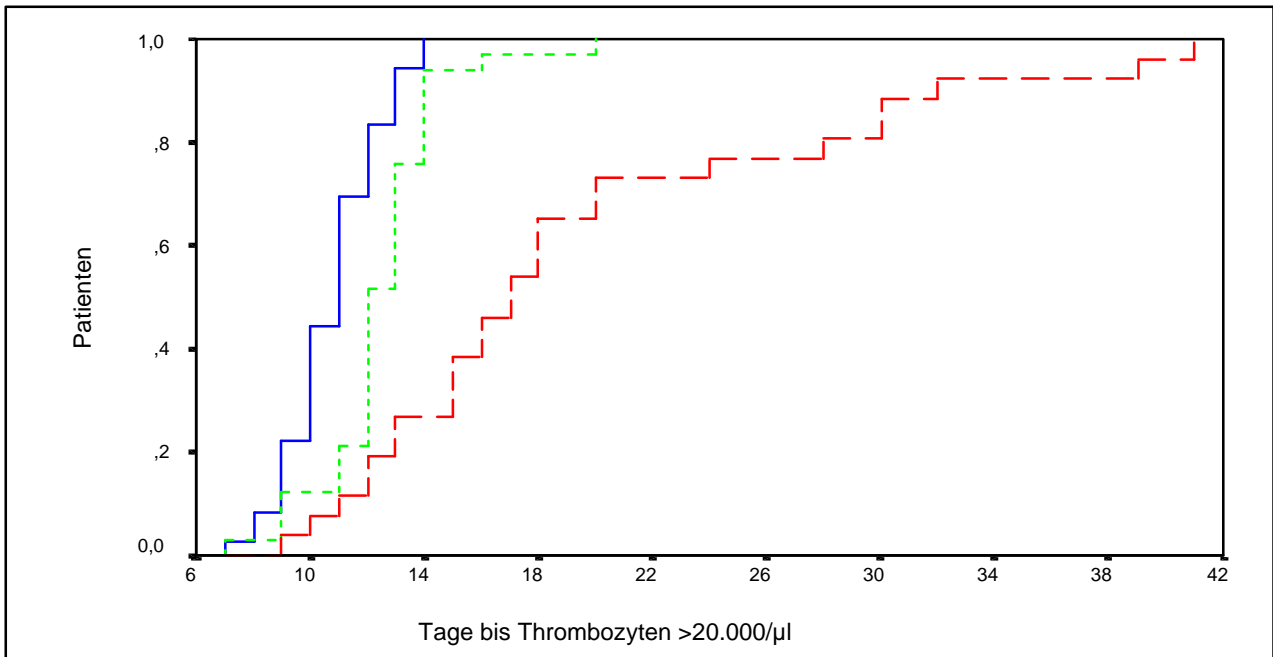
Tage bis Erreichen von Granulozyten >500/ $\mu$ l			Log rank Test
CFU-GM/kg <10 <sup>7</sup> /kg	CFU-GM/kg $\geq$ 10 <sup>7</sup> /kg <20 <sup>7</sup> /kg	CFU-GM/kg >20 <sup>7</sup> /kg	p-Wert
11 (8-27)	10 (8-14)	10 (8-12)	0,007
11 (8-27)	10 (8-14)		0,050
11 (8-27)		10 (8-12)	0,002
	10 (8-14)	10 (8-12)	ns

es sind jeweils Median und Range angegeben

ns: nicht signifikant

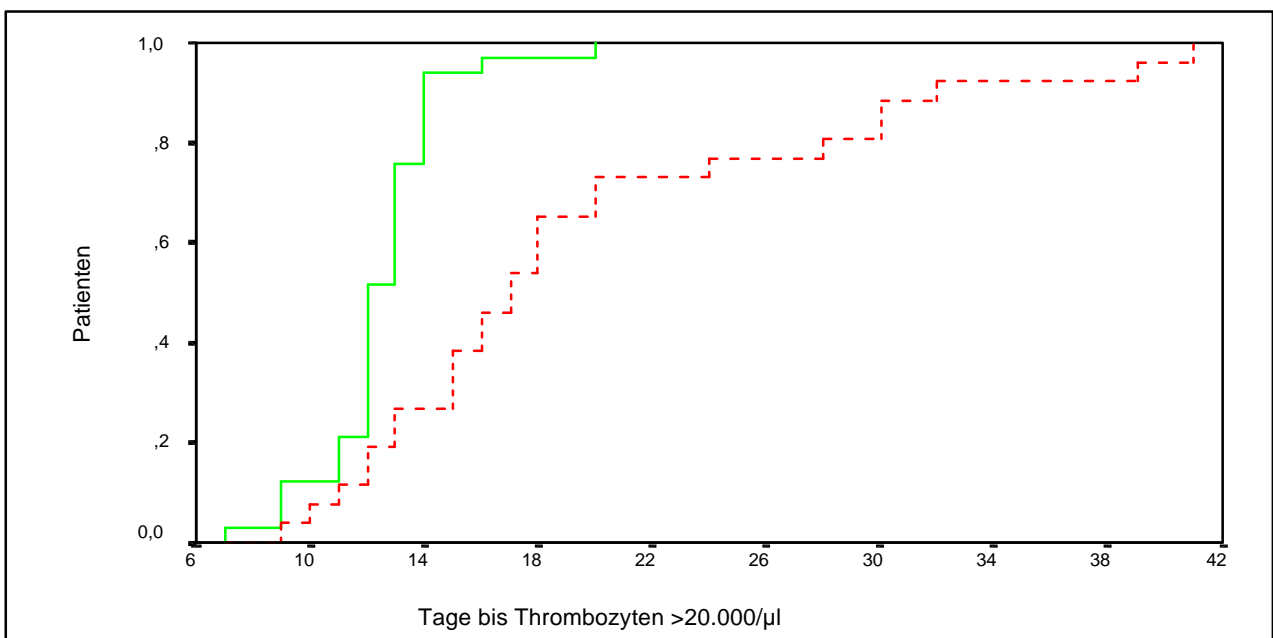
### 3.1.10.2.6.3. CD34+ Zellen und Regeneration der Thrombozyten

Die Regeneration der Thrombozyten in den drei Patientengruppen mit unterschiedlicher CD34+ Zelldosis ist in der Abbildung 27 dargestellt. Patienten, die weniger als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen erhielten, erreichten Thrombozyten  $>20.000/\mu$ l nach einer signifikant längeren Zeit als Patienten mit  $\geq 2,5 \times 10^6 \leq 5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg oder mit  $>5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (Tabelle 28, Abbildung 28, Abbildung 29). Die Erholung der Thrombozyten war zwischen den Patienten mit einer Zelldosis  $\geq 2,5 \times 10^6 \leq 5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg und Patienten mit  $>5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg ebenfalls statistisch signifikant unterschiedlich (Tabelle 28, Abbildung 30).



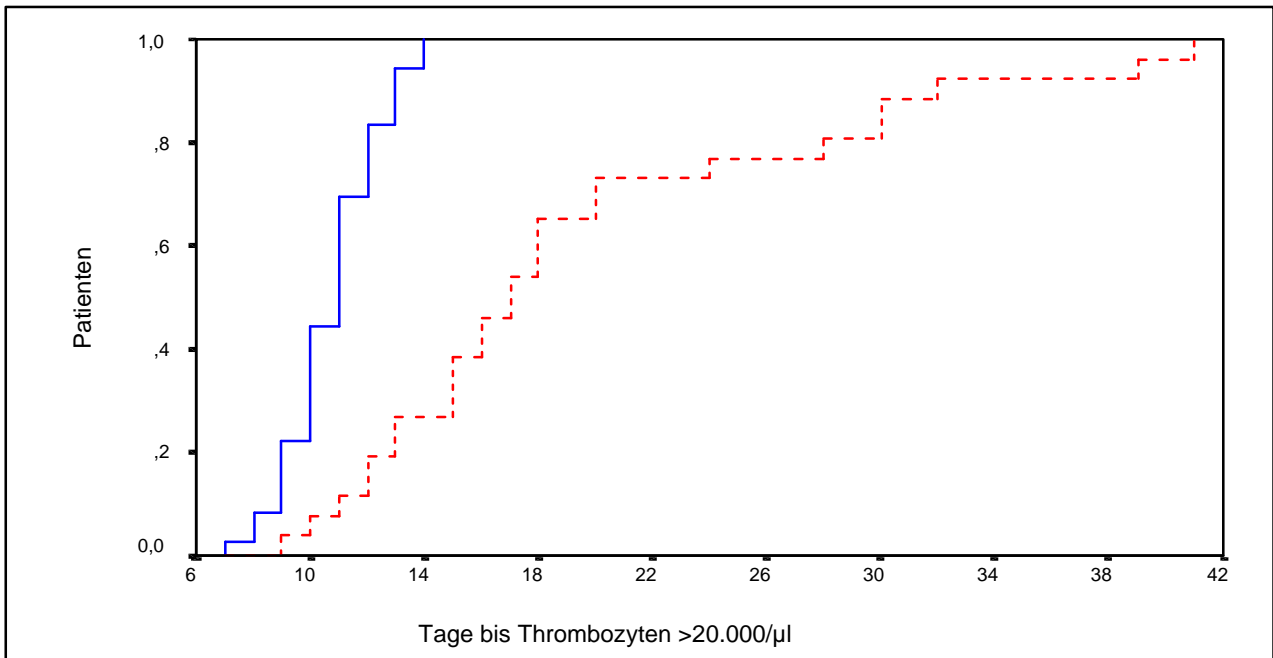
CD34+ Zellen/kg:  $>5 \times 10^6$ : durchgehende Linie;  $\geq 2,5 \leq 5 \times 10^6$ : fein gestrichelt;  $< 2,5 \times 10^6$ : grob gestrichelt

**Abbildung 27. Regeneration der Thrombozyten in Abhängigkeit von der Dosis der transplantierten CD34+ Zellen/kg**



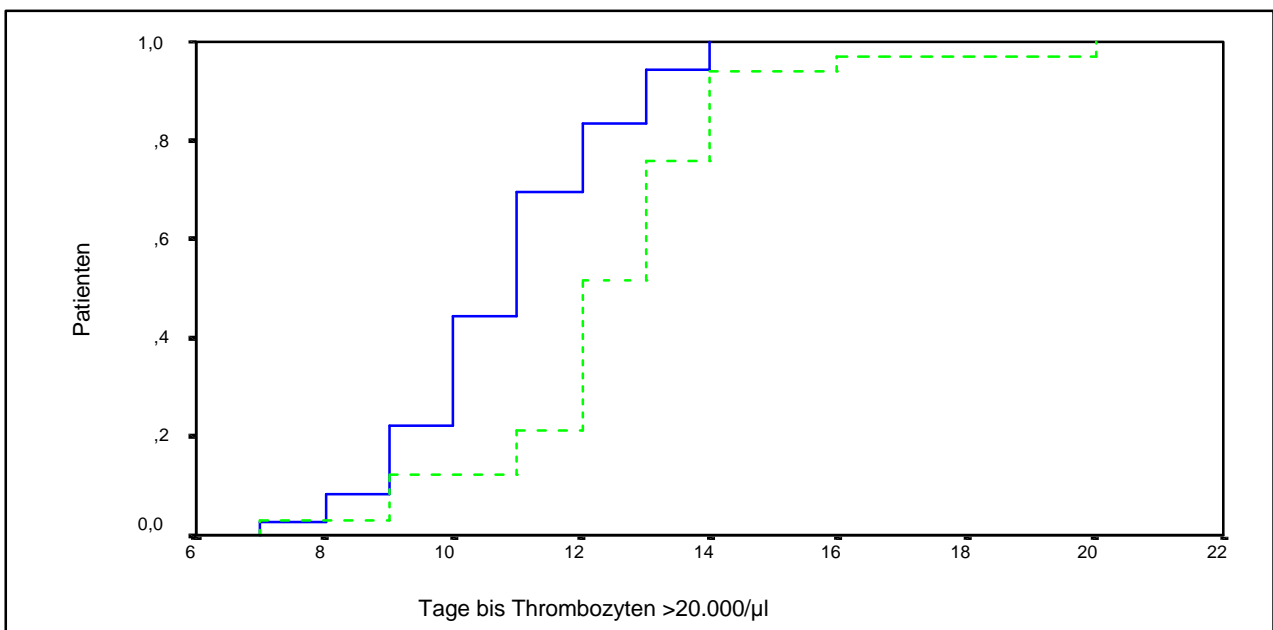
CD34+ Zellen/kg:  $\geq 2,5 \leq 5 \times 10^6$ : durchgehende Linie;  $< 2,5 \times 10^6$ : fein gestrichelt

**Abbildung 28. Regeneration der Thrombozyten in Abhängigkeit von der Dosis der transplantierten CD34+ Zellen/kg**



CD34+ Zellen/kg:  $>5 \times 10^6$ : durchgehende Linie;  $<2,5 \times 10^6$ : fein gestrichelt

**Abbildung 29. Regeneration der Thrombozyten in Abhängigkeit von der Dosis der transplantierten CD34+ Zellen/kg**



CD34+ Zellen/kg:  $>5 \times 10^6$ : durchgehende Linie;  $\geq 2,5 \leq 5 \times 10^6$ : fein gestrichelt

**Abbildung 30. Regeneration der Thrombozyten in Abhängigkeit von der Dosis der transplantierten CD34+ Zellen/kg**

**Tabelle 28. Einfluß der transplantierten CD34+ Zellen/kg auf die Regeneration der Thrombozyten nach Hochdosischemotherapie**

Tage bis Erreichen von Thrombozyten >20.000/ $\mu$ l			Log rank Test
CD34+ Zellen/kg <2,5 $\cdot$ 10 <sup>6</sup>	CD34+ Zellen/kg $\geq$ 2,5 $\cdot$ 10 <sup>6</sup> $\leq$ 5,0 $\cdot$ 10 <sup>6</sup>	CD34+ Zellen/kg >5,0 $\cdot$ 10 <sup>6</sup>	p-Wert
17 (9-202)	12 (7-20)	11 (7-14)	0,000
17 (9-202)	12 (7-20)		0,000
17 (9-202)		11 (7-14)	0,000
	12 (7-20)	11 (7-14)	0,002

es sind jeweils Median und Range angegeben

ns: nicht signifikant

#### 3.1.10.2.6.4. CFU-GM und Regeneration der Thrombozyten

Der Gruppenvergleich zwischen Patienten mit weniger als  $10 \times 10^4$  CFU-GM/kg und Patienten mit mehr als  $20 \times 10^4$  CFU-GM/kg ergab einen signifikanten Vorteil in der Rekonstitution der Thrombozyten für die Patienten mit der höheren Zelldosis ( $p=0,023$ ). Vergleiche zwischen Patientengruppen mit  $<10 \times 10^4$  CFU-GM/kg und  $\geq 10 \times 10^4 \leq 20 \times 10^4$  CFU-GM/kg, sowie zwischen mit  $\geq 10 \times 10^4 \leq 20 \times 10^4$  CFU-GM/kg und  $>20 \times 10^4$  CFU-GM/kg waren nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 29).

**Tabelle 29. Einfluß der transplantierten CFU-GM/kg auf die Regeneration der Thrombozyten nach Hochdosischemotherapie**

Tage bis Erreichen von Thrombozyten >20.000/ $\mu$ l			Log rank Test
CFU-GM/kg <math>10^4</math>	CFU-GM/kg >math>10^4</math> <math>20^4</math>	CFU-GM/kg >math>20^4</math>	p-Wert
13 (8-39)	12 (7-30)	12 (7-28)	0,046
13 (8-39)	12 (7-30)		ns
13 (8-39)		12 (7-28)	0,023
	12 (7-30)	12 (7-28)	ns

es sind jeweils Median und Range angegeben

ns: nicht signifikant

### 3.1.10.2.6.5. Andere Parameter

Alter der Patienten, die Lokalisation des Primärtumors, die Histologie, das Stadium der Erkrankung und die Höhe der Tumormarker (AFP, HCG) bei Erstdiagnose, die Dauer und Anzahl der Zyklen der primären Chemotherapie, die kumulativen Dosen der verabreichten zytostatischen Medikamente (Cisplatin, Etoposid, Ifosfamid, Bleomycin), die Zeit zwischen der Primärtherapie und Mobilisationschemotherapie, das Krankheitsstadium und die Höhe von AFP und HCG vor Mobilisationschemotherapie, sowie das Ansprechen auf die "salvage" Chemotherapie spielten für die Rekonstitution der Granulo- und Thrombopoese keine statistisch signifikante Rolle.

### **3.1.10.2.7. Multivariate Analyse (Cox Regression) prädiktiver Faktoren für die hämatopoetische Rekonstitution nach Hochdosischemotherapie**

Zur Identifikation von unabhängigen Faktoren mit Einfluß auf die Rekonstitution der Granulo- und Thrombopoese nach Hochdosischemotherapie, wurde die Cox Regressionsanalyse als multivariate Analyse für Parameter, die in der univariaten Analyse (log rank Test) statistisch signifikant waren, durchgeführt. Hierbei handelte es sich um die transplantierte Dosis der CD34+ Zellen/kg und CFU-GM/kg mit der identischen Gruppeneinteilung wie im log rank Test:

Einteilung nach der Zelldosis an CD34+ Zellen/kg:

1.  $<2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (n=27)
2.  $\geq 2,5 \times 10^6 \leq 5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (n=33)
3.  $>5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (n=36)

Einteilung nach der Menge an CFU-GM/kg:

1.  $<10 \times 10^4$  CFU-GM/kg (n=24)
2.  $\geq 10 \times 10^4 \leq 20 \times 10^4$  CFU-GM/kg (n=37)
3.  $>20 \times 10^4$  CFU-GM/kg (n=30)

#### **3.1.10.2.7.1. Rekonstitution der Granulozyten**

In der Cox Regressionsanalyse wurde die transfundierte Menge an CFU-GM/kg eliminiert. Es verblieb als signifikanter Faktor für die Rekonstitution der Granulozyten die Dosis der transplantierten CD34+ Zellen/kg (Tabelle 30).

### 3.1.10.2.7.2. Rekonstitution der Thrombozyten

Die übertragene Dosis an CFU-GM/kg wurde in der Cox Regressionsanalyse erneut eliminiert. Die transplantierte Menge der CD34+ Zellen/kg verblieb als signifikanter Parameter für die Regeneration der Thrombozyten (Tabelle 30).

**Tabelle 30. Gegenüberstellung der uni- und multivariaten Analyse der prädiktiven Faktoren für die hämatopoetische Rekonstitution**

	Prädiktion für die Rekonstitution der Granulozyten >500/ $\mu$ l	
<b>Patientengruppen (Transplantierte Zelldosis)</b>	<b>Univariate Analyse*</b>	<b>Multivariate Analyse**</b>
CD34+ Zellen/kg: <2,5; $\geq$ 2,5 $\leq$ 5,0; >5,0 ( $\times 10^6$ )	0,000	0,000
CFU-GM/kg: <10; $\geq$ 10 $\leq$ 20; >20 ( $\times 10^4$ )	0,007	ns
	Prädiktion für die Rekonstitution der Thrombozyten >20.000/ $\mu$ l	
<b>Patientengruppen (Transplantierte Zelldosis)</b>	<b>Univariate Analyse*</b>	<b>Multivariate Analyse**</b>
CD34+ Zellen/kg: <2,5; $\geq$ 2,5 $\leq$ 5,0; >5,0 ( $\times 10^6$ )	0,000	0,000
CFU-GM/kg: <10; $\geq$ 10 $\leq$ 20; >20 ( $\times 10^4$ )	0,046	ns

ns: nicht signifikant

\*log rank Test

\*\*Cox-Regressionanalyse

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß der einzige Parameter, der die Rekonstitution der Granulozyten  $>500/\mu\text{l}$  und Thrombozyten  $>20.000/\mu\text{l}$  nach einer Hochdosischemotherapie statistisch signifikant beeinflusst, die Dosis der transplantierten CD34+ Zellen/kg ist.

### **3.1.10.3. Supportivtherapie nach Hochdosischemotherapie und Transplantation autologer Blutstammzellen**

#### **3.1.10.3.1. Gesamtkollektiv und einzelne Patientengruppen**

Sechsendneunzig Patienten entwickelten in der Posttransplantationsphase im Median an 5 Tagen (0-17) Fieber und erhielten für 9 Tage (0-22) eine i.v. antibiotische Therapie. In dieser Zeit wurden den Patienten im Median 4 Erythrozytenkonzentrate (0-24) und 4 Thrombozytenkonzentrate (1-19) transfundiert. Der stationäre Aufenthalt betrug 24 Tage (19-58). Die genannten Parameter waren in den einzelnen Patientengruppen vergleichbar, es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Tabelle 31).

**Tabelle 31. Supportivtherapie nach Hochdosischemotherapie**

	<b>PEI/CEI (n=55)</b>	<b>TIP/CET (n=22)</b>	<b>TI/CET (n=19)</b>	<b>Gesamt (n=96)</b>
Temperatur $\geq 38,0^{\circ}\text{C}$ (Tage)	<b>4,5</b> (0-17)	<b>5,5</b> (1-14)	<b>3</b> (1-12)	<b>5</b> (0-17)
Antibiotikatherapie (Tage)	<b>9</b> (0-22)	<b>9,5</b> (4-19)	<b>8,5</b> (5-18)	<b>9</b> (0-22)
Erythrozyten Konzentrate	<b>5</b> (0-24)	<b>5</b> (2-19)	<b>4</b> (2-10)	<b>4</b> (0-24)
Thrombozyten Konzentrate	<b>5</b> (1-19)	<b>5</b> (2-12)	<b>3,5</b> (1-12)	<b>4</b> (1-19)
Krankenhausaufenthalt (Tage)	<b>23,5</b> (19-58)	<b>24</b> (21-48)	<b>23,5</b> (19-53)	<b>24</b> (19-58)

es sind jeweils Median und Range angegeben

ns: nicht signifikant

### 3.1.10.3.2. Rolle der Dosis transplantierte CD34+ Zellen

Da in der multivariaten Analyse (Cox Regression) der prädiktiven Parameter für die Rekonstitution der Hämatopoese nach Hochdosischemotherapie ausschließlich die transfundierte Dosis der CD34+ Zellen/kg statistisch signifikant war, wurden die Daten der Supportivtherapie in den drei Patientengruppen analysiert, die in die Cox Regressionsanalyse eingingen. Der Gruppenvergleich im Kruskal-Wallis Test ergab statistische Signifikanz für die transfundierten Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrate, die Tage mit antibiotischer Therapie und den Aufenthalt im Krankenhaus (Tabelle 32).

Tabelle 32. Supportivtherapie nach Hochdosischemotherapie

	CD34+ Zellen >5,0 · 10 <sup>6</sup> /kg	CD34+ Zellen ≈2,5-5,0 · 10 <sup>6</sup> /kg	CD34+ Zellen <2,5 · 10 <sup>6</sup> /kg	Kruskal- Wallis Test
Patienten (n=)	<b>36</b>	<b>33</b>	<b>27</b>	<b>p-Wert</b>
Temperatur ≥38,0°C (Tage)	<b>2,5</b> (0-12)	<b>5</b> (1-16)	<b>6</b> (1-17)	ns
Antibiotikatherapie (Tage)	<b>8</b> (0-14)	<b>9</b> (5-21)	<b>10</b> (6-22)	0,001
Erythrozyten Konzentrate	<b>4</b> (0-12)	<b>4</b> (0-12)	<b>6</b> (4-24)	0,013
Thrombozyten Konzentrate	<b>4</b> (1-11)	<b>4</b> (1-18)	<b>6</b> (2-19)	0,006
Krankenhausaufenthalt (Tage)	<b>22</b> (19-43)	<b>24</b> (20-53)	<b>26</b> (21-58)	0,000

es sind jeweils Median und Range angegeben

ns: nicht signifikant

Im Vergleich einzelner Gruppen ergab die Analyse im Mann-Whitney Test für Patienten mit  $\geq 2,5 \leq 5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg gegenüber Patienten mit  $< 2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg signifikant weniger Transfusionen mit Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten, sowie einen kürzeren Aufenthalt im Krankenhaus (Tabelle 33).

**Tabelle 33. Supportivtherapie nach Hochdosischemotherapie**

	<b>CD34+ Zellen ≥2,5-5,0·10<sup>6</sup>/kg</b>	<b>CD34+ Zellen &lt;2,5·10<sup>6</sup>/kg</b>	<b>Mann-Whitney Test</b>
Patienten	<b>33</b>	<b>27</b>	<b>p-Wert</b>
Temperatur ≥38,0°C (Tage)	<b>5</b> (1-16)	<b>6</b> (1-17)	ns
Antibiotikatherapie (Tage)	<b>9</b> (5-21)	<b>10</b> (6-22)	ns
Erythrozyten Konzentrate	<b>4</b> (0-12)	<b>6</b> (4-24)	0,007
Thrombozyten Konzentrate	<b>4</b> (1-18)	<b>6</b> (2-19)	0,002
Krankenhausaufenthalt (Tage)	<b>24</b> (20-53)	<b>26</b> (21-58)	0,004

es sind jeweils Median und Range angegeben

ns: nicht signifikant

Patienten, die eine Zelldosis  $>5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg erhalten haben, hatten statistisch signifikant weniger Transfusionseinheiten, Fieber- und Antibiotikage und einen kürzeren Krankenhausaufenthalt als Patienten mit  $<2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (Tabelle 34).

**Tabelle 34. Supportivtherapie nach Hochdosischemotherapie**

	<b>CD34+ Zellen &gt;5,0 · 10<sup>6</sup>/kg</b>	<b>CD34+ Zellen &lt;2,5 · 10<sup>6</sup>/kg</b>	<b>Mann-Whitney Test</b>
Patienten (n=)	<b>36</b>	<b>27</b>	<b>p-Wert</b>
Temperatur ≥38,0°C (Tage)	<b>2,5</b> (0-12)	<b>6</b> (1-17)	0,032
Antibiotikatherapie (Tage)	<b>8</b> (0-14)	<b>10</b> (6-22)	0,000
Erythrozyten Konzentrate	<b>4</b> (0-12)	<b>6</b> (4-24)	0,013
Thrombozyten Konzentrate	<b>4</b> (1-11)	<b>6</b> (2-19)	0,002
Krankenhausaufenthalt (Tage)	<b>22</b> (19-43)	<b>26</b> (21-58)	0,000

es sind jeweils Median und Range angegeben

ns: nicht signifikant

Zwischen Patienten mit einer transplantierten Zelldosis größer als  $5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg und Patienten mit der mittleren Dosis  $\geq 2,5 \leq 5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg, waren der stationäre Aufenthalt und die Tage mit antibiotischer Therapie statistisch signifikant unterschiedlich (Tabelle 35).

**Tabelle 35. Supportivtherapie nach Hochdosischemotherapie**

	<b>CD34+ Zellen &gt;5,0 · 10<sup>6</sup>/kg</b>	<b>CD34+ Zellen ≈2,5-5,0 · 10<sup>6</sup>/kg</b>	<b>Mann-Whitney Test</b>
Patienten	<b>36</b>	<b>33</b>	
Temperatur ≥38,0°C (Tage)	<b>2,5</b> (0-12)	<b>5</b> (1-16)	ns
Antibiotikatherapie (Tage)	<b>8</b> (0-14)	<b>9</b> (5-21)	0,020
Erythrozyten Konzentrate	<b>4</b> (0-12)	<b>4</b> (0-12)	ns
Thrombozyten Konzentrate	<b>4</b> (1-11)	<b>4</b> (1-18)	ns
Krankenhausaufenthalt (Tage)	<b>22</b> (19-43)	<b>24</b> (20-53)	0,037

es sind jeweils Median und Range angegeben

ns: nicht signifikant

Insgesamt kann festgehalten werden, daß Patienten mit einer transplantierten Zelldosis  $<2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg eine intensivere Supportivtherapie und einen signifikant längeren Krankenhausaufenthalt benötigten als Patienten mit mehr als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg.

## 4. Diskussion

### 4.1. Mobilisation und Separation peripherer Blutstammzellen

Die vorliegende Analyse beruht auf Daten von 120 Patienten mit rezidivierten und/oder refraktären malignen Keimzelltumoren, die in der Zeit von Januar 1993 bis Juli 1998 in der Abteilung für Innere Medizin mit Schwerpunkt Hämatologie/Onkologie (Leiter: Prof. Dr. med. D. Huhn), Virchow-Klinikum der Humboldt-Universität, erhoben wurden. Die Behandlungsstrategie bestand aus drei bis vier Zyklen einer zytostatischen Rezidivtherapie ("salvage" Chemotherapie) gefolgt von einer Hochdosischemotherapie. Trotz des Fehlens von kontrollierten randomisierten Studien wird bei Patienten mit rezidivierten und/oder refraktären Keimzelltumoren eine Verbesserung der Langzeit-überlebensrate von 20% nach konventioneller "salvage" Chemotherapie auf bis zu 50% nach Hochdosischemotherapie erwartet (118-120). Die Durchführung einer Hochdosischemotherapie, die für den Patienten wegen der ausgeprägten Myelosuppression potentiell gefährlich ist, setzt das Vorhandensein eines patienteneigenen (autologen) hämatopoetischen Transplantats, bestehend aus Knochenmark und/oder peripheren Blutstammzellen, voraus. Die hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, die rechtzeitig vor der Hochdosischemotherapie gesammelt und kryokonserviert werden müssen, werden dem Patienten retransfundiert, um die Rekonstitution der Hämatopoese zu gewährleisten und zu beschleunigen. Im letzten Jahrzehnt haben die peripheren Blutstammzellen aufgrund einiger Vorteile, die sowohl in der Gewinnung als auch in der hämatopoetischen Regeneration nach Hochdosischemo-/Radiotherapie begründet sind, die klassische autologe Knochenmarktransplantation zunehmend verdrängt (7-10).

Autologe hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen werden in der Regel durch eine krankheitsadaptierte Chemotherapie und einen hämatopoetischen Wachstumsfaktor aus dem Knochenmark in die Blutbahn mobilisiert und mittels Leukapherese am Zellseparator gewonnen (87-94).

Die Mobilisation peripherer Blutstammzellen erfolgte in unserem Patientenkollektiv durch eine "salvage" Chemotherapie wie folgt: 66 Patienten erhielten PEI, 26 Patienten TIP

und 28 Patienten TI. Hinsichtlich der Patientencharakteristika wie Alter, Tumorlokalisierung, Histologie, Krankheitsstadium, Ansprechen auf die primäre Chemotherapie und Intensität der Vorbehandlung (Therapiezyklen, Medikamentendosis) waren die drei Gruppen vergleichbar. Der einzige signifikante Unterschied bestand in der medianen G-CSF-Dosis, die nach der Mobilisierungstherapie verabreicht wurde: PEI-Patienten erhielten 4,8 µg/kg/d, TIP-Patienten 5,8 µg/kg/d und TI-Patienten 9,7 µg/kg/d. Am ersten Apheresetag hatten TI-Patienten signifikant höhere zirkulierende CD34+ Zellen als TIP-Patienten: 60,5/µl versus 15,7/µl ( $p=0,001$ ). Auf den ersten Blick scheint dies auf der signifikant höheren G-CSF-Dosis der TI-Patienten zu beruhen. Hierzu ist jedoch einschränkend zu sagen, daß ein eindeutiges Dosis-Wirkungsphänomen zwischen G-CSF und der Mobilisation peripherer Blutstammzellen bislang in wenigen Studien lediglich im "steady state", das heißt unter Ruhebedingungen ohne vorausgehende Chemotherapie, gezeigt werden konnte (77-79). Einige Autoren konnten selbst bei der "steady state" Mobilisation keinen signifikanten Anstieg der zirkulierenden CD34+ Zellen bei höherer G-CSF-Dosis nachweisen. So konnten Nademanee et al bei Patienten mit malignen Lymphomen, die zur Mobilisierung G-CSF 10 µg/kg/d erhielten ( $n=26$ ), weder die Anzahl der Leukapheresen senken noch einen höheren Ertrag an CD34+ Zellen/kg im Vergleich zu Patienten mit G-CSF 5 µg/kg/d ( $n=39$ ) erzielen (127). Bishop et al mobilisierten bei Patienten mit hämatologischen Malignomen und soliden Tumoren periphere Blutstammzellen mit GM-CSF 125 µg/m<sup>2</sup>/d ( $n=34$ ) oder 250 µg/m<sup>2</sup>/d ( $n=24$ ) durch (76). Weder die mediane Zahl der Apheresen noch die gesammelten CFU-GM waren zwischen beiden Gruppen signifikant unterschiedlich. In einer aktuell publizierten Arbeit fanden Martin-Murea et al bei Patienten mit Plasmozytom keinen Zusammenhang zwischen der applizierten G-CSF-Dosis, 300 µg/d ( $n=67$ ) versus 600-1.200 µg/d ( $n=37$ ), und der Zahl zirkulierender CD34+ Zellen nach einer Mobilisationstherapie (128). Diese Erkenntnis wird durch unsere Daten gestützt, da die Zahl der peripheren CD34+ Zellen bei PEI- und TI-Patienten, trotz einer signifikanten Differenz in der medianen G-CSF-Dosis mit 4,8 µg/kg/d versus 9,7 µg/kg/d ( $p=0,001$ ), bei Beginn der Apheresen mit 43,4/µl versus 60,5/µl vergleichbar war. Die Tatsache, daß die Zahl der peripheren CD34+ Zellen mit 43,4/µl bei PEI-Patienten signifikant höher war als mit 15,7/µl bei TIP-Patienten ( $p=0,001$ ), bei Vergleichbarkeit der Patientengruppen bezüglich Vorbehandlung und G-CSF-Dosis (4,8 µg/kg/d versus 5,8 µg/kg/d), läßt vermuten, daß andere,

derzeit noch unbekannte Faktoren die Mobilisation von CD34+ Zellen beeinflussen dürften. Ein solcher Faktor ist möglicherweise die Mobilisationschemotherapie selbst. Wir vermuten, daß die schlechte Mobilisation bei TIP-Patienten in der zytotoxisch-myelosuppressiven Interaktion von Taxol und Cisplatin begründet ist. Von den TIP-Patienten (n=26) benötigten 7 Patienten einen zweiten Chemotherapiezyklus und ein Patient drei TIP-Zyklen für die Gewinnung eines Blutstammzelltransplantats. Von 66 PEI-Patienten und 28 TI-Patienten benötigte aus jeder Gruppe jeweils nur ein Patient einen zweiten Mobilisierungszyklus.

Die Leukapheresen begannen bei TI-Patienten median am Tag 9 nach Ende der Chemotherapie und damit signifikant früher als bei PEI- und TIP-Patienten am Tag 14 bzw Tag 15 ( $p=0,001$ ;  $p=0,001$ ). Demirer et al leiteten die Leukapheresen nach Mobilisation mit Taxol und Cyclophosphamid am Tag 11 und nach Cisplatin, Etoposid und Cyclophosphamid am Tag 14 ein (129). Diese Daten sind mit unseren Beobachtungen nach TI- und PEI-Mobilisation vergleichbar, natürlich mit der Einschränkung, daß Demirer et al Cyclophosphamid statt Ifosfamid in der Kombinationschemotherapie eingesetzt haben. Der signifikant spätere Apheresebeginn bei PEI- und TIP-Patienten mag mit einer stärkeren und länger dauernden Myelosuppression zusammenhängen, die mit einem Nadir von 700 Leukozyten/ $\mu\text{l}$  nach PEI und 1.000 Leukozyten/ $\mu\text{l}$  nach TIP einhergeht. Im Gegensatz hierzu liegt nach TI-Mobilisation der tiefste mediane Leukozytenwert bei 2.400/ $\mu\text{l}$ . Die leichtere Myelosuppression nach TI wird durch die signifikant höhere mediane Thrombozytenzahl am ersten Apheresetag ebenfalls veranschaulicht.

Da Patienten mit PEI und TI bei Beginn der Leukapheresen signifikant höhere zirkulierende CD34+ Zellen hatten als TIP-Patienten, konnten durch die erste Apherese bei PEI- und TI-Patienten im Median signifikant mehr CD34+ Zellen/kg gesammelt werden als bei TIP-Patienten:  $2,9 \times 10^6/\text{kg}$  und  $3,0 \times 10^6/\text{kg}$  versus  $1,0 \times 10^6/\text{kg}$  ( $p=0,001$ ;  $p=0,001$ ). Die Separationsergebnisse der ersten Leukapherese zeigen, daß bei mehr als der Hälfte sowohl der PEI- als auch der TI-Patienten bereits eine Zelldosis größer als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg gewonnen wurde. Die Reinfusion von  $\geq 2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg nach Hochdosischemotherapie wird von einigen Autoren empfohlen, weil diese Zelldosis zu einer schnellen und dauerhaften Regeneration der Granulozyten und

Thrombozyten führt (107-111). Dies würde bedeuten, daß mehr als die Hälfte der PEI- und TI-Patienten mit einer einzigen normalvolumigen Leukapherese (8-12 l) die angestrebte Zelldosis erreicht. Bei TIP-Patienten, die CD34+ Zellen unbefriedigend mobilisierten, konnten jedoch nur bei einer Minderheit mehr als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg mit der ersten Leukapherese gesammelt werden. Diese Zelldosis konnte selbst durch kumulative Apherese nur in der Hälfte der TIP-Patienten erreicht werden, wobei im Median drei Separationen (1-7) pro Patient durchgeführt wurden. Deswegen kann die Kombinationschemotherapie TIP zur Mobilisation peripherer Blutstammzellen bei Patienten mit malignen Keimzelltumoren in der vorliegenden Form nicht empfohlen werden. Kumulative Apherese erbrachten bei PEI-Patienten einen signifikant höheren Ertrag an CD34+ Zellen/kg als bei TI-Patienten,  $7,1 \times 10^6$ /kg versus  $3,6 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg ( $p=0,04$ ), bei vergleichbaren zirkulierenden und gesammelten CD34+ Zellen bei der ersten Leukapherese. Die Erklärung hierfür ist einfach, da PEI-Patienten im Median zwei Apherese (1-5) hatten, TI-Patienten jedoch nur eine Separation (1-4). Dieser Unterschied wird dadurch erklärt, daß bei PEI-Patienten unabhängig von der Zahl peripherer CD34+ Zellen die Durchführung von zwei Leukapherese angestrebt wurde. Die Sammlung von CFU-GM durch kumulative Leukapherese war in den drei Patientengruppen vergleichbar:  $14,6 \times 10^4$ /kg bei PEI-,  $15,3 \times 10^4$ /kg bei TIP- und  $19,3 \times 10^4$  CFU-GM/kg bei TI-Patienten. Die Vergleichbarkeit der gesammelten CFU-GM bei gleichzeitig signifikanten Unterschieden bei gewonnenen CD34+ Zellen in den drei Patientengruppen hängt wahrscheinlich mit einer ungleichen Klonogenität der separierten Zellen zusammen. So konnten Serke et al zeigen, daß die Klonogenität von CD34+ Zellen mit steigender Zellzahl kontinuierlich abnimmt (132).

#### **4.2. Prädiktive Parameter für die Mobilisation und Separation von CD34+ Zellen**

Wir unternahmen den Versuch prädiktive Parameter für die Mobilisation und Separation von CD34+ Zellen innerhalb der Gesamtpopulation zu identifizieren.

Die Analyse im Mann-Whitney Test ließ folgende Faktoren identifizieren, die mit einer guten Mobilisation und Separation assoziiert waren: Alter  $\leq 30$  Jahre, zytostatische Vor-

therapie mit  $\leq 6$  Zyklen, kumulative Dosis Cisplatin  $\leq 500 \text{ mg/m}^2$ , Etoposid  $\leq 2.500 \text{ mg/m}^2$ , Ifosfamid  $\leq 24 \text{ g/m}^2$  und eine Mobilisationschemotherapie mit PEI oder TI.

In der multivariaten Analyse (multiple lineare Regression) wurden jedoch die kumulativen Dosen für Cisplatin und Etoposid sowohl für zirkulierende als auch gesammelte CD34+ Zellen, die Ifosfamid-Dosis für die separierten CD34+ Zellen eliminiert. Als voneinander unabhängige Parameter, die sowohl für die Zahl der peripheren als auch gewonnenen CD34+ Zellen von signifikantem Wert waren, verblieben in der multiplen linearen Regression das Patientenalter, die zytostatische Vorbehandlung und die Mobilisationschemotherapie. Hierbei hatten ein Patientenalter  $\leq 30$  Jahre, eine Vortherapie mit  $\leq 6$  Zyklen und eine Mobilisierung mit PEI oder TI einen signifikant positiven Einfluß auf die Zahl der zirkulierenden und gesammelten CD34+ Zellen.

Bezüglich des Patientenalters existieren in der Literatur gegensätzliche Meinungen. So konnten Bensinger et al bei 54 Patienten mit hämatologischen Malignomen und soliden Tumoren, die G-CSF  $16 \mu\text{g/kg/d}$  zur Mobilisierung erhielten, ein höheres Alter als nachteilig für die Gewinnung von CD34+ Zellen identifizieren (133). Chabannon et al fanden ebenfalls, daß das Alter der Patienten den Ertrag der Leukapheresen signifikant beeinflusste (134). Im Gegensatz hierzu konnten Goldschmidt et al bei 103 Patienten mit Plasmozytom, die Cyclophosphamid plus G-CSF zur Mobilisation erhielten, keinen Einfluß des Alters auf die Sammlung von CD34+ Zellen feststellen (135). Dreger et al fanden bei 52 Patienten mit malignen Lymphomen nach einer Mobilisation mit unterschiedlichen Chemotherapieregimen und/oder G-CSF keinen Zusammenhang zwischen Patientenalter und Ergebnis der Stammzellernte (136). Weaver et al analysierten die Separationsdaten von 497 Patienten, mobilisiert mit Cyclophosphamid, Etoposid und G-CSF, ohne jedoch eine Auswirkung des Patientenalters auf die gesammelten CD34+ Zellen zu finden (137). Zwei weitere Studien fanden ebenfalls keine Korrelation zwischen Patientenalter und Leukaphereseertrag (108, 138). Diese Diskrepanz zwischen den meisten Studien und unseren Untersuchungen könnte diagnosebedingt sein, da in den zitierten Arbeiten keine Daten von Patienten mit Keimzelltumoren analysiert wurden.

Eine ausgedehnte zytostatische und/oder strahlentherapeutische Vorbehandlung wird im allgemeinen als potentieller Nachteil für die Mobilisation peripherer Blutstammzellen

angesehen. Dies gilt vor allem dann, wenn in der Vortherapie Zytostatika wie Melphalan, Carmustin und/oder Lomustin zum Einsatz kommen, denen eine potentielle hämatopoetische Stammzelltoxizität zugeschrieben wird (139-141). So fanden Dreger et al bei 52 Patienten mit malignen Lymphomen eine Vorbehandlung mit mehr als einem Zyklus DexaBEAM, die unter anderem Melphalan  $20 \text{ mg/m}^2$  und Carmustin  $60 \text{ mg/m}^2$  pro Zyklus enthielt, als prognostisch signifikant ungünstig auf die gesammelten CD34+ Zellen und CFU-GM (136). Goldschmidt et al identifizierten bei 103 Plasmozytom-Patienten die Dauer der chemotherapeutischen Vorbehandlung mit Melphalan, nicht jedoch die verabreichte kumulative Dosis, als signifikant aussagefähig für den Ertrag der Leukapherese (135). Haas et al konnten bei 61 Patienten mit malignen Lymphomen einen Vorteil für die Sammlung von CD34+ Zellen für diejenigen Patienten ausarbeiten, die mit  $\leq 6$  Zyklen einer zytostatischen Chemotherapie vorbehandelt waren (108). Zu vergleichbaren Ergebnissen, wie von Haas et al erhoben, kamen Weaver et al, Shepherd et al, Tarella et al und Bensinger et al (137, 142-144). Andere Untersucher konnten jedoch keine Korrelation zwischen vorausgehender Chemotherapie und der Mobilisation oder Separation peripherer Blutstammzellen feststellen (66, 129, 138, 145). Einen interessanten Ansatz verfolgten Drake et al in einer kürzlich publizierten Analyse (146). Sie teilten die zytostatischen Medikamente der Vortherapie nach ihrer hämatopoetischen Toxizität ein, wobei stammzelltoxische Zytostatika mit der höchsten Punktzahl (=4) bewertet wurden und Medikamente mit geringer Myelosuppression eine 1 zur Bewertung erhielten. Die anderen Zytostatika bekamen je nach Hämatotoxizität 2 oder 3 Punkte. Mit dieser Bewertung berechneten die Autoren einen kumulativen Werte-Index eines jeden Patienten auf der Basis der vorausgehenden Chemotherapie. Die Daten von 74 Patienten, die nahezu alle an hämatologischen Malignomen litten ( $n=71$ ), wurden ausgewertet. Nach der Multivarianzanalyse (multiple lineare Regression) verblieb die Vortherapie mit einem oder mehreren Zytostatika des Toxizitätsfaktors 4 als einzelner Parameter mit signifikantem Einfluß auf die Sammlung von CD34+ Zellen/kg und CFU-GM/kg (146). Im unserem Patientenkollektiv spielten stammzelltoxische Substanzen keine Rolle, da diese Zytostatika in der Therapie von malignen Keimzell-tumoren keine Anwendung finden. Die Multivarianzanalyse zeigte jedoch, daß eine intensive Vorbehandlung mit mehr als 6 Zyklen einer Chemotherapie mit den Substanzen Cisplatin, Etoposid, Bleomycin und/oder Ifosfamid zu einer signifikanten Abnahme der

Mobilisierung peripherer Blutstammzellen führte.

Ein weiterer Parameter, der die Mobilisation und Sammlung von zirkulierenden Blutstammzellen negativ beeinflussen kann, ist eine ausgedehnte Radiotherapie in der Vorbehandlung des Patienten (108, 136, 144, 145). Da eine Strahlentherapie im vorliegenden Patientenkollektiv lediglich von untergeordneter Bedeutung war, wurde sie nicht in die Analyse einbezogen.

Gelegentlich wird über die mögliche Rolle eines Knochenmarkbefalls durch maligne Zellen für die Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen berichtet (108, 129, 144). Dieser Faktor spielte für unsere Patientengruppe ebenfalls keine Rolle, da bei Patienten mit malignen Keimzelltumoren der Befall des Knochenmarks eine ausgesprochene Rarität darstellt.

Passos-Coelho et al untersuchten bei 23 Patientinnen mit Mammacarcinom die Mobilisierung von Blutstammzellen mit CPM und G-CSF und fanden eine signifikante Korrelation zwischen der Prozentzahl von CD34+ Zellen im "steady state" Knochenmark und den nach Mobilisierung gesammelten CD34+ Zellen/kg (147). Dieses Vorgehen sollte jedoch auf Studien oder Einzelfälle beschränkt bleiben, da es die Durchführung eines invasiven diagnostischen Eingriffs (Knochenmarkpunktion) voraussetzt, dessen Wertigkeit zur Zeit nicht endgültig beurteilt werden kann.

#### **4.3. Prädiktive Faktoren für den Ertrag der Leukapherese**

Ziel der Blutstammzellseparation ist die Gewinnung eines hämatopoetisch suffizienten Transplantats, das nach einer Hochdosischemotherapie zu einer schnellen und dauerhaften Regeneration der Hämatopoese führt. Um den Zeitpunkt des Apheresebeginns bestimmen zu können und die Separationen effizient zu gestalten, bedarf es prädiktiver Faktoren, die den Ertrag einer Leukapherese mit hoher Wahrscheinlichkeit voraussagen lassen. Aus diesem Grunde haben viele Arbeitsgruppen den Versuch unternommen einen möglichst einfach zu bestimmenden prädiktiven Faktor zu identifizieren. Hierfür schien das Blutbild geradezu prädestiniert, da die peripheren

Blutstammzellen während der Mobilisation aus dem Knochenmark in die Blutzirkulation ausgeschwemmt werden.

In frühen Mitteilungen empfahlen Cantin et al und Reid et al den Zeitpunkt des Anstiegs der Leukozyten nach durchschrittenem Nadir oder die simultane Erholung der Thrombozyten und Monozyten für die Einleitung der Leukapheresen (148, 149). Kotasek et al und Craig et al nahmen eine ansteigende Leukozytenzahl größer als 1.000/ $\mu$ l als Surrogatmarker um die Apherese zu beginnen (66, 96). Trotz dieser frühen Versuche einen guten Aphereseertrag zu prognostizieren mußten bis zu sechs Separationen durchgeführt werden, um das gewünschte Transplantat zu erhalten. Fukuda et al und Dreger et al konnten vor allem dann gute Aphereseerträge erzielen, wenn die Leukozytenzahlen im peripheren Blut 10.000/ $\mu$ l überschritten (89, 90). Pettengell et al und Jones et al berichteten über Patienten mit malignen Lymphomen, bei denen nach einer Chemotherapie plus G-CSF Blutstammzellseparationen durchgeführt wurden (48, 49). Hierbei konnten beide Arbeitsgruppen mit einer einzelnen Leukapherese ausreichende CD34+ Zellen und CFU-GM sammeln, wenn die Leukozytenzahlen im peripheren Blut mehr als 3.000/ $\mu$ l bzw. 8.000/ $\mu$ l betragen. Die Autoren waren jedoch nicht in der Lage zwischen der Zahl zirkulierender Leukozyten und der Dosis der gesammelten CD34+ Zellen und CFU-GM eine signifikante Korrelation zu finden, um den Ertrag der Leukapheresen voraussagen zu können. Olivieri et al fanden eine signifikante Korrelation zwischen der Zahl der MNC des peripheren Blutes und den gesammelten CFU-GM (150). Sie folgerten daraus, daß die einfache Bestimmung der MNC vor der Apherese der beste prädiktive Parameter für die Stammzellernte sei, wobei oberhalb von 1.900 MNC/ $\mu$ l mit einem Ertrag  $\geq 5 \times 10^4$  CFU-GM/kg gerechnet werden konnte. Webb et al beschrieben bei Patientinnen mit Mammacarcinom, die eine zytostatische Chemotherapie und/oder G-CSF zur Mobilisation erhielten, ebenfalls eine gute Korrelation zwischen MNC des peripheren Blutes und gewonnenen CFU-GM (151).

In der vorliegenden Analyse korrelierten die an den Apheresetagen gemessenen Zahlen der zirkulierenden Leukozyten, MNC und CD34+ Zellen schlecht bis mäßig mit gesammelten CFU-GM/kg ( $r=0,31$ ;  $r=0,51$  und  $r=0,54$ ). Leukozyten korrelierten nicht und MNC des peripheren Blutes nur schwach mit den gewonnenen CD34+ Zellen/kg ( $r=0,01$ ;  $r=0,36$ ). Dagegen ergab die Zahl der zirkulierenden CD34+ Zellen am Tag der ersten

Leukapherese eine statistisch hoch signifikante Korrelation mit dem Ertrag der CD34+ Zellen/kg ( $r=0,96$ ;  $p=0,000$ ). Aufgrund der exzellenten Korrelation zwischen peripheren und gesammelten CD34+ Zellen, läßt sich ab einer bestimmten Zahl der zirkulierenden CD34+ Zellen der zu erwartende Ertrag der CD34+ Zellen/kg der ersten Leukapherese voraussagen. Somit kann bei mehr als 40 CD34+ Zellen/ $\mu$ l mit einem Separationsergebnis  $\geq 2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg und bei mehr als 100 CD34+ Zellen/ $\mu$ l mit einem Ertrag  $\geq 5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg gerechnet werden. Hiermit kann die Sammlung eines hämatopoetisch suffizienten Stammzelltransplantats durch eine einzelne normalvolumige Leukapherese (8-12 l), wobei das zwei bis dreifache Blutvolumen des Patienten prozessiert wird, zuverlässig prognostiziert werden. Das bedeutet, daß bei hohen peripheren CD34+ Zellzahlen die Separation hämatopoetischer Stammzellen effizient und patientenfreundlich gestaltet werden kann, weil weitere Leukapheresen eingespart werden können. Diese Erkenntnisse könnten die Durchführung sogenannter "large-volume" Leukapheresen relativieren, die den Einsatz von Heparin voraussetzen und mit einer Separationsdauer von bis zu 6 Stunden mit einer höheren Nebenwirkungsrate behaftet sind, jedoch von einigen Arbeitsgruppen propagiert werden (147, 152, 153). Bei Patienten mit mäßiger Mobilisation peripherer Blutstammzellen (CD34+ Zellen  $<40/\mu$ l) müssen jedoch mehrere konventionelle Leukapheresen (8-12 l) durchgeführt werden, um ein hämatopoetisch suffizientes Transplantat zu erhalten. Hier konnten wir zeigen, daß bei 20 bis 40 CD34+ Zellen/ $\mu$ l mit einem Mindestertrag  $\geq 1,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg gerechnet werden kann. Bei peripheren CD34+ Zellzahlen  $<10/\mu$ l liegt jedoch das Separationsergebnis im Median bei  $0,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg. Daraus geht eindeutig hervor, daß bei Patienten mit schlechter Blutstammzellmobilisierung median 5 Leukapheresen nötig sind, um eine Zelldosis von  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg zu erreichen. Deshalb empfehlen wir bei diesen Patienten von einer Leukapherese abzusehen und im Einzelfall die Entnahme von autologem Knochenmark zu erwägen, um die Option einer Hochdosischemotherapie zu erhalten (95, 154).

Benjamin et al untersuchten 13 Patienten mit malignen Lymphomen, die CPM und G-CSF zur Mobilisation erhielten und fanden lediglich eine schwache Korrelation ( $r=0,43$ ) zwischen zirkulierenden und gesammelten CD34+ Zellen (155). Dieses Ergebnis entspricht weder unseren Erfahrungen noch Berichten anderer Arbeitsgruppen. So

berichteten Haas et al über eine gute Korrelation zwischen peripheren und separierten CD34+ Zellen ( $r=0,8$ ) bei 61 Patienten mit malignen Lymphomen nach einer Mobilisation mit konventioneller Chemotherapie und G-CSF (108). Sie beschrieben erstmals einen Schwellenwert von 50 CD34+ Zellen/ $\mu\text{l}$ , der für einen Aphereseertrag von  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen prädiktiv war. Wir selbst konnten in einer präliminären Analyse von 60 Patienten mit hämatologischen Erkrankungen und soliden Tumoren aufgrund einer hoch signifikanten Korrelation zwischen zirkulierenden und gesammelten CD34+ Zellen ( $r=0,94$ ;  $p=0,000$ ) ein Leukaphereseergebnis mit  $\geq 2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg bei hoher Wahrscheinlichkeit voraussagen, wenn die Zahl der CD34+ Zellen im peripheren Blut den Wert von 40/ $\mu\text{l}$  überschritt (110). Elliott et al und Papadopoulos et al berichteten ebenfalls über hohe Korrelationen zwischen peripheren und separierten CD34+ Zellen ( $r=0,94$ ;  $r=0,73$ ) bei Patienten mit verschiedenen Malignomen (130, 156). Elliott et al konnten zeigen, daß neben der signifikanten Korrelation zwischen peripheren und gesammelten CD34+ Zellen des Apheresetages ( $r=0,94$ ), eine weitere hohe Korrelation zwischen den zirkulierenden CD34+ Zellen des Vortages und dem Apheresergebnis besteht ( $r=0,84$ ). Mitterer et al verfolgten einen interessanten Ansatz um den Ertrag der CD34+ Zellen zu prognostizieren (157). Sie analysierten die Stammzellmobilisationsdaten von 28 Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen und entwickelten eine mathematische Formel zur Berechnung des zu prozessierenden Blutvolumens, das einen bestimmten Ertrag an CD34+ Zellen erwarten ließ. Es zeigte sich jedoch, daß bei Leukozyten  $>20.000/\mu\text{l}$  und/oder CD34+ Zellen  $<15/\mu\text{l}$ , gemessen am Tag der Apherese, die Formel mit einer nicht unerheblichen Fehlerquote behaftet war.

Die aktuelle Analyse legt die Schlußfolgerung nahe, daß die Zahl der peripheren CD34+ Zellen, gemessen am Tag der Leukapherese, den besten prädiktiven Parameter für gesammelte CD34+ Zellen darstellt. Aufgrund der hohen Korrelation zwischen zirkulierenden und separierten CD34+ Zellen kann das Aphereseergebnis mit hoher Wahrscheinlichkeit prognostiziert werden. Diese Erkenntnisse erlauben eine sichere Bestimmung des Zeitpunkts für die Einleitung der Leukapheresen und ermöglichen die Sammlung eines hämatopoetisch suffizienten Stammzelltransplantats durch eine einzige konventionelle Leukapherese. Hierdurch könnten überflüssige Apheresen mit nachfolgender Kryokonservierung und weitere G-CSF-Gaben eingespart werden. Unter

diesen Bedingungen ließen sich die Mobilisation und Separation peripherer Blutstammzellen ökonomisch gestalten, was vor allem bei den aktuell knappen Finanzressourcen der öffentlichen Hand wünschenswert wäre.

#### 4.4. Hämatopoetische Rekonstitution nach Hochdosischemotherapie

Von 120 Patienten mit kryokonservierten hämatopoetischen Transplantaten erhielten 101 Patienten eine Hochdosischemotherapie. Insgesamt waren 96 Patienten für die Analyse der hämatopoetischen Regeneration und des Posttransplantationsverlaufs nach Retransfusion der peripheren Blutstammzellen auswertbar. Patienten mit PEI-Mobilisation erhielten Hochdosis-CEI (n=55), TIP-Patienten (n=22) und TI-Patienten (n=19) Hochdosis-CET.

Es wurden im Median folgende Zelldosen transplantiert:

Patienten mit PEI-CEI:  $5,8 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg und  $14,6 \times 10^4$  CFU-GM/kg.

Patienten mit TIP-CET:  $2,8 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg und  $15,4 \times 10^4$  CFU-GM/kg.

Patienten mit TI-CET:  $4,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg und  $19,3 \times 10^4$  CFU-GM/kg.

Patienten mit PEI-CEI und TI-CET erhielten eine signifikant höhere Menge an CD34+ Zellen/kg als Patienten mit TIP-CET ( $p=0,002$ ;  $p=0,023$ ). Die Menge der reinfundierten CFU-GM/kg war in allen drei Gruppen vergleichbar.

Die hämatopoetische Regeneration mit Granulozyten  $>500/\mu\text{l}$ , Thrombozyten  $>20.000/\mu\text{l}$  wurde nach dem folgenden medianen Zeitraum erreicht:

Patienten mit PEI-CEI: 10 (8-27) bzw. 11 (7-39) Tage.

Patienten mit TIP-CET: 10 (9-20) bzw. 13 (10-202) Tage.

Patienten mit TI-CET: 9 (8-12) bzw. 12,5 (9-28) Tage.

Die Rekonstitution der Granulozyten war in den drei Patientengruppen vergleichbar. Patienten mit PEI-CEI erreichten Thrombozyten  $>20.000/\mu\text{l}$  signifikant schneller als

Patienten mit TIP-CET ( $p=0,001$ ). Andere Vergleiche der Thrombozytenregeneration zwischen den einzelnen Gruppen waren statistisch nicht signifikant. Somit konnte trotz signifikanter Unterschiede zwischen einzelnen Patientengruppen in der Dosis der transplantierten CD34+ Zellen lediglich ein einziger statistisch signifikanter Unterschied in der hämatopoetischen Regeneration gefunden werden. Hierfür könnten folgende Tatsachen verantwortlich sein: einerseits war die Zahl der Patienten für einen Vergleich der Gruppen TIP-CET und TI-CET wahrscheinlich zu klein um statistische Signifikanz zu erreichen, andererseits dürfte die Thrombopoese, im Gegensatz zur Granulopoese, im Hinblick auf die transplantierte Dosis der CD34+ Zellen/kg der sensiblere Parameter sein.

Basierend auf eigenen präliminären Ergebnissen und Daten anderer Arbeitsgruppen, haben wir die hämatopoetische Rekonstitution von Patienten, die eine Zelldosis  $\geq 2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg erhalten haben, mit Patienten verglichen denen weniger als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg retransfundiert worden waren. Im Gesamtkollektiv hatten 69 Patienten ein Transplantat mit mehr als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg und 27 Patienten erhielten weniger als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg. Patienten mit der höheren Zelldosis erreichten Granulozyten  $>500/\mu\text{l}$  in einem medianen Zeitraum von 9 Tagen (7-12) verglichen mit 12 Tagen (10-27) bei Patienten mit der geringeren Zelldosis. Thrombozyten  $>20.000/\mu\text{l}$  wurden nach 12 Tagen erreicht in der Patientengruppe mit der höheren Zelldosis und nach 17 Tagen (9-202) von Patienten mit der niedrigeren Zelldosis. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren statistisch hoch signifikant ( $p<0,000$ ;  $p<0,000$ ). Diese Erkenntnisse werden durch die Daten anderer Arbeitsgruppen gestützt (108, 109, 111). Haas et al berichteten, daß die Rekonstitution der Hämatopoese nach Hochdosistherapie bei 35 Patienten mit einer Zelldosis  $\geq 2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg signifikant schneller erfolgte als bei 7 Patienten, die weniger als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg erhalten hatten (108). Schwartzberg et al zeigten in einem heterogenen Patientenkollektiv ( $n=52$ ), daß eine schnelle Rekonstitution der autologen Hämatopoese durch die Retransfusion von mehr als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg erreicht werden konnte (109). Schiller et al untersuchten die Regenerationsdaten von 37 Patienten mit Plasmozytom und stellten fest, daß eine Zelldosis  $>2,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg zu einer signifikant schnelleren Erholung der Granulo- und Thrombozyten führte als eine Dosis  $<2,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (111).

Die Daten der hämatopoetischen Rekonstitution, die wir im Gesamtkollektiv erhoben haben, zeigen in Übereinstimmung mit der vorhandenen Literatur, daß bei der Transplantation peripherer Blutstammzellen eine Schwellendosis existiert, die das Tempo der Regeneration von Granulozyten und Thrombozyten nach Hochdosischemotherapie signifikant beschleunigt. Aus diesem Grunde sollte bei der Durchführung einer Blutstammzellapherese die Gewinnung eines Transplantats mit mehr als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg angestrebt werden.

#### **4.5. Prädiktive Faktoren für die hämatopoetische Rekonstitution nach Hochdosischemotherapie**

Die univariate Analyse von Parametern mit einem möglichen Einfluß auf die Erholung der Hämatopoese ergab im log rank Test lediglich für die übertragenen CD34+ Zellen/kg und CFU-GM/kg statistische Signifikanz. Alle anderen analysierten Faktoren, ins-besondere das Patientenalter und die zytostatische Vorbehandlung, in der Multi-varianzanalyse für die Mobilisation und Separation peripherer Blutstammzellen von signifikantem Wert, waren für die Regeneration der Granulozyten und Thrombozyten ohne Bedeutung.

In der Multivarianzanalyse (Cox Regression) wurde die Menge der übertragenen CFU-GM/kg, die für die Granulo- und Thrombopoese im log rank Test signifikant war, eliminiert. Somit verblieb die Dosis der transplantierten CD34+ Zellen/kg als einziger Faktor mit signifikantem Einfluß auf das Tempo der hämatopoetischen Regeneration.

Bei der Analyse der transfundierten CD34+ Zellen/kg und der Regeneration von Granulozyten und Thrombozyten ließen sich im log rank Test drei Patientengruppen mit unterschiedlicher Zelldosis diskriminieren, die auch die Grundlage für die Multivarianzanalyse (Cox Regression) bildeten:

1. Gruppe:  $< 2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (n=27)
2. Gruppe:  $\geq 2,5 \times 10^6 \leq 5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (n=33)
3. Gruppe:  $> 5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (n=36)

In der Rekonstitution der Granulopoese benötigten Patienten mit einer Zelldosis  $<2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg eine signifikant längere Zeit als Patienten mit  $\geq 2,5 \times 10^6 \leq 5,0 \times 10^6$  oder mit  $>5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg: 12 (10-27) versus 10 (8-12) bzw. 9 Tage (8-12). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit der höheren Zelldosis war statistisch nicht signifikant.

In der Regeneration der Thrombozyten brauchten Patienten mit einer Zelldosis  $<2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg signifikant länger als Patienten mit  $\geq 2,5 \times 10^6 \leq 5,0 \times 10^6$  oder mit  $>5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg: 17 (9-20) versus 12 (7-20) bzw. 11 Tage (7-14). Hierbei war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit der höheren Zelldosis statistisch signifikant.

Mitteilungen der aktuellen Literatur verweisen in Untersuchungen zur Rekonstitution der Hämatopoese nach Hochdosischemo-/Radiotherapie auf eine signifikante Rolle der transplantierten CFU-GM/kg und/oder CD34+ Zellen/kg. Weaver et al analysierten die Daten der hämatopoetischen Rekonstitution bei 692 Patienten vorwiegend mit Mammacarcinom (71%), die sich einer Hochdosischemotherapie unterzogen haben (113). Sie konnten nach einer Multivarianzanalyse (Cox Regression) zeigen, daß der einzige Parameter, der sowohl die Regeneration der Granulozyten als auch der Thrombozyten signifikant beeinflusste, die transfundierte Dosis der CD34+ Zellen/kg war. Weiterhin stellten sie fest, daß eine Zelldosis  $\geq 5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg zu einer schnellen und sicheren Rekonstitution der Hämatopoese führte, wobei oberhalb einer Dosis von  $10,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg zu einer weiteren signifikanten Beschleunigung kam. Bensinger et al untersuchten die Erholung der Hämatopoese bei 243 Patienten mit hämatologischen Erkrankungen und soliden Tumoren nach einer Hochdosischemo-/Radiotherapie (144). Sie konnten nach einer Multivarianzanalyse zeigen, daß die Dosis der transplantierten CD34+ Zellen/kg sowohl die Granulo- als auch die Thrombopoese signifikant beeinflusste. Hierbei regenerierten Patienten mit mehr als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg schneller als Patienten mit weniger als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg. Eine Zelldosis  $\geq 5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg führte zu einer weiteren Beschleunigung der Thrombopoese, war jedoch auf die Granulopoese ohne weiteren Effekt. Watts et al konnten bei 81 Patienten mit malignen Lymphomen eine Zelldosis größer als  $3,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg als optimal definieren, um innerhalb von 14 Tagen Granulozyten  $>500/\mu\text{l}$  und 21 Tagen

Thrombozyten  $>20.000/\mu\text{l}$  zu erreichen (145). Desweiteren empfahlen die Autoren die Transfusion einer Mindestdosis von  $1,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg, um eine verzögerte hämatopoetische Regeneration zu vermeiden. Bensinger et al empfahlen ebenfalls die Transplantation einer Mindestmenge von  $1,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (133). Pérez-Simón et al untersuchten die Hämatopoese nach Hochdosis-chemotherapie bei Patienten mit Mammacarcinom und hämatologischen Malignomen ( $n=71$ ) und beschrieben die Transfusion von mehr als  $0,75 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg als ausreichend (158). Es bleibt jedoch zu bemerken, daß bei einigen Patienten mit einer transplantierten Menge  $<2,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg die Regenerationszeit der Thrombozyten ( $>20.000/\mu\text{l}$ ) mit bis zu 45 Tagen recht lang war. In unserem Patientenkollektiv mußte nach Transplantation einer Zelldosis  $<2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg mit einer bis zu 6 Wochen dauernden Regeneration der Thrombozyten gerechnet werden. Wir sind deshalb der Meinung, daß nach einer Hochdosischemotherapie die Transfusion einer Zelldosis  $\geq 2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg angestrebt werden sollte, um eine verzögerte hämatopoetische Rekonstitution zu vermeiden und damit das Transplantationsrisiko für den Patienten zu minimieren. Ketterer et al identifizierten in einer Multivarianzanalyse bei 153 Patienten mit lymphoproliferativen Erkrankungen lediglich die Menge der transplantierten CD34+ Zellen/kg als signifikant prädiktiv für die hämatopoetische Regeneration (159). Die Transfusion von weniger als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg war mit einer verzögerten Rekonstitution der Granulo- und Thrombozyten assoziiert. Desweiteren konnten die Autoren eine Gruppe von Patienten identifizieren, die eine hohe Zelldosis mit mehr als  $15,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg erhalten hatten, wodurch die Erholung der Hämatopoese im Vergleich zu Patienten mit einer Dosis  $>2,5 \times 10^6 \leq 15 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg signifikant beschleunigt wurde. Diese hohe Zelldosis hatten jedoch nur 24% der Patienten durch drei Leukapheresen (1-6) erreicht. Wir sind der Meinung, daß eine Zelldosis  $>15 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg von vielen Patienten nicht erreicht wird, schon gar nicht durch eine einzelne Apherese, wodurch die klinische Praktikabilität auf wenige Fälle beschränkt bleibt. In unseren Untersuchungen erreichten lediglich 13% der Patienten mehr als  $15,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß ein autologes Blutstammzelltransplantat mit mehr als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg für die Durchführung einer Hoch-

dosischemotherapie ausreichend ist, um nach tiefer Myelosuppression eine schnelle Rekonstitution der Granulozyten und Thrombozyten zu bewirken. Die Transplantation einer Zelldosis  $\geq 5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg führt lediglich zu einer weiteren marginalen Beschleunigung der Thrombopoese.

#### **4.6. Supportivtherapie nach Hochdosischemotherapie und Transplantation autologer Blutstammzellen**

Die Parameter der Supportivtherapie wurden in den drei Gruppen miteinander verglichen, deren Einteilung nach der transplantierten Dosis der CD34+ Zellen/kg erfolgte, dem einzigen Faktor mit signifikantem Einfluß auf die hämatopoetische Rekonstitution nach Hochdosischemotherapie. Die Analyse ergab, daß Patienten mit mehr als  $5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg signifikant weniger Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrate, weniger Fieber- und Antibiotika- und Krankenhaustage aufwiesen als Patienten mit einer Zelldosis  $< 2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg. Der Vergleich der Patienten mit der mittleren Zelldosis  $\geq 2,5 \times 10^6 \leq 5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg hatten signifikant weniger Blutprodukte (Erythrozyten-/Thrombozytenkonzentrate) und einen kürzeren Krankenhausaufenthalt als Patienten mit weniger als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg. Der Vergleich zwischen Patienten mit der hohen Zelldosis und Patienten mit der mittleren Zelldosis ergab lediglich bei Antibiotika- und Krankenhaustagen einen leicht signifikanten Vorteil für die Gruppe mit der hohen Zelldosis.

Im Gegensatz zu Rekonstitution der Hämatopoese nach Hochdosistherapie, die in den meisten Mitteilungen ausführlich abgehandelt wird, existieren derzeit in der Literatur wenige Publikationen über die Analyse anderer Parameter des klinischen Verlaufs nach Transplantation von autologen peripheren Blutstammzellen. So konnten Papadopoulos et al keinen signifikanten Unterschied feststellen hinsichtlich der Transfusionshäufigkeit und des Krankenhausaufenthalts zwischen Patientinnen mit Mammacarcinom und einer Dosis  $> 2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg und Patientinnen, die  $\geq 1,0 \times 10^6 \leq 2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg erhalten hatten, wobei die Patientenzahl mit 34 recht klein war (155). Remes et al untersuchten 35 Patienten mit vorwiegend hämatologischen Erkrankungen, die eine

Hochdosischemotherapie erhielten, und fanden bei Patienten mit mehr als  $4,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg eine signifikant geringere Transfusionshäufigkeit mit Thrombozytenkonzentraten als bei Patienten mit weniger als  $4,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (160). Die Zahl der Erythrozytenkonzentrate und der Krankenhaustage war jedoch in beiden Patientengruppen vergleichbar. Schiller et al fanden signifikant weniger Transfusionen in einem Kollektiv von Patienten mit Plasmozytom, wenn die Patienten mit mehr als  $2,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg transplantiert wurden (111). Haas et al untersuchten die Mobilisation peripherer Blutstammzellen bei 61 Patienten mit malignen Lymphomen, von denen 42 Patienten eine Hochdosistherapie erhielten (108). Patienten mit mehr als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg hatten weniger Tage mit antibiotischer Therapie, eine geringere Zahl von Thrombozytentransfusionen und einen kürzeren Krankenhausaufenthalt als Patienten mit weniger als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg. Zimmerman et al berichteten bei 21 Patientinnen mit Mammacarcinom über signifikant weniger Antibiotikage und Thrombozytentransfusionen sowie eine kürzere Hospitalisation nach Hochdosischemotherapie, wenn die transfundierte Zelldosis mehr als  $0,75 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg betrug (161). Ketterer et al untersuchten 168 Blutstammzelltransplantationen bei 153 Patienten mit lymphoproliferativen Erkrankungen (159). Sie fanden bei Patienten mit  $>2,5 \times 10^6$   $<15,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (n=105) weniger Therapietage mit Antibiotika und Thrombozyten und einen kürzeren Krankenhausaufenthalt als bei Patienten mit einer geringeren Zelldosis (n=22). Die Analyse ergab bei Patienten mit mehr als  $15,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg (n=41) eine weitere signifikante Abnahme der Thrombozytentransfusionen und des Krankenhausaufenthalts im Vergleich zu Patienten, die Transplantate mit einer Zelldosis  $>2,5 \times 10^6$   $<15,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg erhalten hatten. Diese Unterschiede waren, obwohl statistisch signifikant, lediglich geringfügig: Patienten mit der hohen Zelldosis erhielten im Median ein Thrombozytenkonzentrat weniger während eines um einen Tag kürzeren Krankenhausaufenthalts. Man sollte jedoch bedenken, daß eine Transplantation mit der Zelldosis von mehr als  $15,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg auf 24% der Fälle beschränkt blieb. Ob diese marginale Verbesserung in der Supportivtherapie klinischen Nutzen erlangen wird, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

In unserem Kollektiv benötigten Patienten mit weniger als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg eine intensivere Supportivtherapie nach Hochdosischemotherapie als Patienten mit einer

höheren Zelldosis. Ein Transplantat mit mehr als  $5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg bewirkte lediglich eine marginale Verkürzung der Antibiotikatherapie und des stationären Aufenthalts im Vergleich zu Patienten mit einer Dosis  $\geq 2,5 \times 10^6 \leq 5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg.

#### **4.7. Schlußfolgerung**

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Mobilisation und Separation peripherer Blutstammzellen bei Patienten mit malignen Keimzelltumoren durch das Alter, die zytostatische Vorbehandlung und die Mobilisationschemotherapie signifikant beeinflusst wird. Oberhalb eines Schwellenwerts der zirkulierenden CD34+ Zellen kann das Ergebnis einer Leukapherese zuverlässig prognostiziert werden. Der einzige signifikant prädiktive Parameter für die hämatopoetische Rekonstitution nach Hochdosischemotherapie ist die Dosis der transplantierten CD34+ Zellen/kg. Nach Transplantation von mehr als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg kann mit einem weitgehend komplikationsarmen Verlauf und einer routinemäßigen Supportivtherapie gerechnet werden.

## 5. Zusammenfassung

Wir untersuchten die Mobilisation und Separation peripherer Blutstammzellen nach einer "salvage" Chemotherapie bei 120 Patienten mit rezidivierten und/oder refraktären malignen Keimzelltumoren. Sechszwanzig Patienten erhielten eine Hochdosischemotherapie mit Retransfusion autologer Blutstammzellen und waren für die Analyse der hämatopoetischen Rekonstitution und der Supportivtherapie auswertbar.

Im ersten Teil der Arbeit konnten wir durch die Multivarianzanalyse (multiple lineare Regression) das Alter, die chemotherapeutische Vorbehandlung und die Mobilisierungschemotherapie als unabhängige Faktoren definieren, die die Mobilisation und Separation von Blutstammzellen signifikant beeinflussten. So waren ein Patientenalter bis 30 Jahre, eine Chemotherapie mit bis zu 6 Zyklen und Mobilisierung mit PEI oder TI mit einer signifikant höheren Mobilisation und Separation peripherer Blutstammzellen assoziiert. Der beste prädiktive Parameter für das Ergebnis einer Leukapherese war die am Apheresetag gemessene Zahl der peripheren CD34+ Zellen/ $\mu$ l. Somit konnten oberhalb einer Zellzahl von 40 bzw. 100 CD34+ Zellen/ $\mu$ l Separationsergebnisse mit mehr als  $2,5 \times 10^6$  oder  $5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg zuverlässig vorausgesagt werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Untersuchung ließ sich mit Hilfe der Multivarianzanalyse (Cox Regression) die transplantierte Dosis der CD34+ Zellen/kg als einziger unabhängiger Parameter definieren, der für die Regeneration der Granulo- und Thrombopoese von signifikantem Wert war. Anhand der transfundierten Zelldosis konnten drei Gruppen definiert werden: Patienten mit  $<2,5 \times 10^6$ ,  $\geq 2,5 \times 10^6 \leq 5,0 \times 10^6$  und  $>5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg. Bei einer Zelldosis  $<2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg war das Tempo der hämatopoetischen Regeneration im Vergleich zu beiden anderen Gruppen signifikant verlangsamt. Die Transplantation von mehr als  $5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg erbrachte gegenüber Patienten mit  $\geq 2,5 \times 10^6 \leq 5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg eine weitere Beschleunigung der Thrombopoese um einen Tag.

Patienten, die weniger als  $2,5 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg erhielten, hatten einen signifikant längeren Krankenhausaufenthalt und eine intensivere Supportivtherapie, ausgedrückt in Antibiotikatherapietagen und Transfusionen mit Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrationen.

traten, als Patienten mit einer höheren Zelldosis. Durch die Transplantation von mehr als  $5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg konnten gegenüber Patienten mit  $\geq 2,5 \times 10^6 \leq 5,0 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg lediglich die antibiotische Therapie und der Krankenhausaufenthalt geringfügig verkürzt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen ermöglichen eine individuelle Beurteilung der Fähigkeit eines Patienten hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut zu mobilisieren. Die zuverlässige Voraussage des Aphereseertrages kann wesentlich dazu beitragen die Einleitung der ersten Leukapherese sicher zu bestimmen und mögliche ineffektive Separationen zu vermeiden. Die Übertragung eines hämatopoetisch suffizienten Transplantats mit schneller Regeneration der Blutbildung reduziert das transplantationsassoziierte Risiko für den Patienten in der Akutphase nach Hochdosischemotherapie, senkt die Kosten der Supportivtherapie und verkürzt den Krankenhausaufenthalt. Da jedoch oberhalb einer bestimmten Transplantatdosis weder eine wesentliche Beschleunigung der hämatopoetischen Rekonstitution noch eine deutliche Minderung der supportivtherapeutischen Maßnahmen zu erwarten sind, könnten überflüssige Apheresen und damit verbundene kostspielige G-CSF Applikationen eingespart werden.

Durch diese Erkenntnisse dürfte die Durchführung der Mobilisation, Separation und Transplantation von autologen Blutstammzellen bei Patienten mit rezidierten und/oder refraktären Keimzelltumoren in einem ökonomisch vernünftigen Rahmen und einer für die Patienten sicheren Behandlungsstrategie gestaltet werden.

## 6. Literatur

1. Thomas ED. Frontiers in bone marrow transplantation. *Blood Cells* 1991; 17: 259-267.
2. Kessinger A, Armitage JO. The evolving role of autologous peripheral stem cell transplantation following high-dose therapy for malignancies. *Blood* 1991; 77: 211-213.
3. Gorin NC, David R, Stachowiak J, et al. High dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation in acute leukemias, malignant lymphomas and solid tumors. *Eur J Cancer* 1981; 17: 557-568.
4. Phillips GL, Herzig RH, Lazarus HM, et al. Treatment of resistant malignant lymphoma with cyclophosphamide, total body irradiation and transplantation of cryopreserved autologous marrow. *N Engl J Med* 1984; 310: 1557-1561.
5. Gale RP, Henon P, Juttner C. Blood stem cell transplants come of age. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9: 151-155.
6. Lowry PA, Tabbara IA. Peripheral hematopoietic stem cell transplantation: current concepts. *Exp Hematol* 1992; 20: 937-942.
7. Körbling M, Holle R, Haas R, et al. Autologous blood stem-cell transplantation in patients with advanced Hodgkin's disease and prior radiation to the pelvic site. *J Clin Oncol* 1990; 8: 978-985.

8. Haas R, Hohaus S, Egerer G, et al. Recombinant human GM-CSF subsequent to chemotherapy improves collection of blood stem cells for autografting in patients not eligible for bone marrow harvest. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9: 459-65.
9. To LB, Roberts MM, Haylock DN, et al. Comparison of haematological recovery times and supportive care requirements of autologous recovery phase peripheral blood stem cell transplants, autologous bone marrow transplants and allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9: 277-284.
10. Beyer J, Schwella N, Zingsem J, et al. Hematopoietic rescue after high-dose chemotherapy using autologous peripheral-blood progenitor cells or bone marrow: a randomized comparison. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1328-1335.
11. Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, et al. Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques. *Blood* 1993; 82: 2605-2610.
12. Craig JIO, Langlands K, Parker AC, Anthony RS. Molecular detection of tumor contamination in peripheral blood stem cell harvests. *Exp Hematol* 1994; 22: 898-902.
13. Passos-Coelho JL, Ross AA, Moss TJ, et al. Absence of breast cancer cells in a single-day peripheral blood progenitor cell collection after priming with cyclophosphamide and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1995; 85: 1138-1143.

14. Brugger W, Bross KJ, Glatt M, et al. Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors. *Blood* 1994; 83: 636-640.
15. Goodman JW, Hodgson GS. Evidence of stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood* 1962; 19: 702-714.
16. Barnes DWH, Loutit JF. Haemopoietic stem cells in the peripheral blood. *Lancet* 1967; 2: 1138-1141.
17. Cavins JA, Scheer SC, Thomas ED, Feerebee JW. The recovery of lethally irradiated dogs given infusions of autologous leukocytes preserved at  $-89^{\circ}\text{C}$ . *Blood* 1964; 23: 38-43.
18. McCredie KB, Hersh EM, Freireich EJ. Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science* 1971; 171: 293-294.
19. Chervenick PA, Boggs DR. In vitro growth of granulocytic and mononuclear cell colonies from blood of normal individuals. *Blood* 1971; 37: 131-135.
20. Kurnick JE, Robinson WA. Colony growth of human peripheral white blood cells in vitro. *Blood* 1971; 37: 136-141.
21. Barr RD, Whang-Peng J, Perry S. Hemopoietic stem cells in human peripheral blood. *Science* 1975; 190: 284-285.

22. Debelak-Fehir KM, Epstein RB. Restoration of hematopoiesis in dogs by infusion of cryopreserved autologous peripheral white cells following busulfan-cyclophosphamide treatment. *Transplantation* 1975; 20: 63-67.
23. Nothdurft W, Bruch C, Fliedner TM, Ruber E. Studies on the regeneration of the CFU-C population in blood and bone marrow of lethally irradiated dogs after autologous transfusion of cryopreserved mononuclear blood cells. *Scand J Haematol* 1977; 19: 470-481.
24. Epstein RB, Sarpel SC. Processing of peripheral blood stem cells for transplantation. *Exp Hematol* 1979; 7 (suppl 5): 125-134.
25. Appelbaum FR. Hemopoietic reconstitution following autologous bone marrow and peripheral blood mononuclear cell infusions. *Exp Hematol* 1979; 7 (suppl 5): 7-11.
26. Zander AR, Gray KN, Hester JP, et al. Rescue by peripheral blood mononuclear cells in dogs from bone marrow failure after total-body irradiation. *Transfusion* 1984; 24: 42-45.
27. Fliedner TM, Körbling M, Arnold R, et al. Collection and cryopreservation of mononuclear blood leukocytes and of CFU-C in man. *Exp Hematol* 1979; 7 (suppl 5): 398-408.
28. Abrams RA, Deisseroth AB. Prospects for accelerating hematopoietic recovery following myelosuppressive therapy by using autologous, cryopreserved hematopoietic stem cells collected solely from the peripheral blood. *Exp Hematol* 1979; 7 (suppl 5): 107-115.

29. Körbling M, Fliedner TM, Pflieger H. Collection of large quantities of granulocyte-macrophage progenitor cells (CFU-C) in man by means of continuous flow leukapheresis. *Scand J Haematol* 1980; 24: 22-28.
30. Lasky LC, Ash RC, Kersey JH, et al. Collection of pluripotential hematopoietic stem cells by cytapheeresis. *Blood* 1982; 59: 822-827.
31. Goldman JM, Th'ng KH, Park DS, et al. Collection, cryopreservation and subsequent viability of haemopoietic stem cells intended for treatment of chronic granulocytic leukaemia in transformation. *Br J Haematol* 1978; 40: 185-195.
32. Haines ME, Goldman JM, Worsley AM, et al. Chemotherapy and autografting for chronic granulocytic leukaemia in transformation: probable prolongation of survival for some patients. *Br J Haematol* 1984; 58: 711-721.
33. Hershko C, Gale RP, Ho WG, Cline MJ. Cure of aplastic anaemia in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria by marrow transfusion from identical twin: Failure of peripheral leukocyte transfusion to correct bone marrow aplasia. *Lancet* 1979; 1: 945-947.
34. Abrams RA, Glaubiger D, Appelbaum FR, Deisseroth AB. Result of attempted hematopoietic reconstitution using isologous, peripheral blood mononuclear cells: A case report. *Blood* 1980; 56: 516-520.

35. Körbling M, Burke P, Braine H, et al. Successful engraftment of blood-derived normal haemopoietic stem cells in chronic myelogenous leukaemia . *Exp Hematol* 1981; 9: 684-690.
36. Juttner CA, To LB, Haylock DN, et al. Circulating autologous stem cells collected in very early remission from acute non-lymphoblastic leukaemia produce prompt but incomplete hemopoietic reconstitution after high dose melphalan or supralethal chemoradiotherapy. *Br J Haematol* 1985; 61: 739-745.
37. Reiffers J, Bernard P, David B, et al. Successful autologous transplantation with peripheral blood hemopoietic cells in a patient with acute leukaemia. *Exp Hematol* 1986; 14: 312-315.
38. Körbling M, Dörken B, Ho AD, et al. Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. *Blood* 1986; 67: 529-532.
39. Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Weisenburger DD. Reconstitution of hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cells. *Exp Hematol* 1986; 14: 192-196.
40. Bell AJ, Oscier DG, Figs A, Hamblin TJ. Use of circulating stem cells to accelerate myeloid recovery after autologous bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1987; 67: 252-253.
41. Zander AR, Cockerill KJ. Autologous transplantation with circulating hematopoietic stem cells. *J Clin Apheresis* 1987; 3: 191-201.

42. Lasky LC, Hurd DD, Smith JA, Haake R. Peripheral blood stem cell collection and use in Hodgkin's disease. *Transfusion* 1989; 29: 323-327.
43. Kessinger A, Armitage JO, Smith DM. High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for patients with lymphoma. *Blood* 1989; 74: 1260-1265.
44. Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, et al. Autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation restores hematopoietic function following marrow ablative therapy. *Blood* 1988; 71: 723-727.
45. Bernard P, Reiffers J, Vezon G, et al. Collection of circulating haemopoietic cells after chemotherapy in acute non-lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1985; 61: 577-578.
46. Dührsen U, Villeval JL, Boyd J, et al. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* 1988; 72: 2074-2081.
47. Socinski MA, Elias A, Schnipper L, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet* 1988; 1: 1194-1198.
48. Pettengell R, Morgenstern GR, Woll PJ, et al. Peripheral blood progenitor cell transplantation in lymphoma and leukemia using a single apheresis. *Blood* 1994; 82: 3770-3777.

49. Jones HM, Jones SA, Watts MJ, et al. Development of a simplified single apheresis approach for peripheral blood progenitor cell transplantation in previously treated patients with lymphoma. *J Clin Oncol* 1994; 12: 1693-1702.
50. Gillespie TW, Hillyer CD. Peripheral blood progenitor cell for marrow reconstitution: mobilization and collection strategies. *Transfusion* 1996; 36: 611-624.
51. Juttner CA, To LB, Ho JQK, et al. Early lympho-hematopoietic recovery after autografting using peripheral blood stem cells in acute nonlymphoblastic leukemia. *Transplant Proc* 1988; 20: 40-42.
52. Gianni AM, Tarella C, Siena A, et al. Durable and complete hematopoietic reconstitution after autografting of rhGM-CSF exposed peripheral blood progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 1990; 6: 143-145.
53. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, et al. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 1984; 133: 157-165.
54. Strauss LC, Rowley SD, La Russa VF, et al. Antigenic analysis of hematopoiesis. V. Characterization of My-10 antigen expression by normal lymphohematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 1986; 14: 878-886.
55. Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID. Monoclonal antibody 12.8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood* 1986; 67: 842-845.

56. Bender JG, Unverzagt KL, Walker DE, et al. Identification and comparison of CD34 positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. *Blood* 1991; 77: 2591-2596.
57. Serke S, Beyer J, Rick O, et al. Analysis of 34-expressing cells in clinical practice. *Vox Sang* 1998; 74 (suppl 2): 469-475.
58. Spangrude GJ, Heimfield S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988, 241: 58-62.
59. Richman CM, Weiner RS, Yankee RA. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood* 1976; 47: 1031-1039.
60. Lohrmann HP, Schreml W, Lang M, et al. Changes of granulopoiesis during and after adjuvant chemotherapy of breast cancer. *Br J Haematol* 1978; 40: 369-381.
61. Abrams RA, Johnston-Early A, Kramer C, et al. Amplification of circulating granulocyte-monocyte stem cell numbers following chemotherapy in patients with extensive small cell carcinoma of the lung. *Cancer Res* 1981; 41: 35-41.
62. Stiff PJ, Murgu AJ, Wittes RE, et al. Quantification of the peripheral blood colony forming unit-culture rise following chemotherapy. Could leukocytaphereses replace bone marrow for autologous transplantation? *Transfusion* 1983; 23: 500-503.

63. To LB, Haylock DN, Kimber RJ, Juttner CA. High levels of circulating haemopoietic stem cells in very early remission from acute non-lymphoblastic leukaemia and their collection and cryopreservation. *Br J Haematol* 1984; 58: 399-410.
64. Schwartzberg L, Birch R, Hazelton B, et al. Peripheral blood stem cell mobilization by chemotherapy with and without recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *J Hematother* 1992; 1: 317-327.
65. To LB, Shepherd KM, Haylock DN, et al. Single high doses of cyclophosphamide enable the collection of high numbers of hemopoietic stem cells from the peripheral blood. *Exp Hematol* 1990; 18: 442-447.
66. Kotasek D, Shepherd KM, Sage RE, et al. Factors affecting blood stem cell collections following high-dose cyclophosphamide mobilization in lymphoma, myeloma, and solid tumors. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9: 11-17.
67. Gianni AM, Bregni M, Siena S, et al. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor reduces hematologic toxicity and widens clinical applicability of high-dose cyclophosphamide treatment in breast cancer and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1990, 8: 768-778.
68. Wong GG, Witek JS, Temple PA, et al. Human GM-CSF: Molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. *Science* 1985; 228: 810-815.
69. Zsebo KM, Cohen AM, Murdock DC, et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: molecular and biological characterization. *Immunobiology* 1986; 172: 175-184.

70. Gropman JE, Molina JM, Scadden DT. Hematopoietic growth factors. Biology and clinical applications. *N Engl J Med* 1989; 321: 1449-1459.
71. Chao NJ, Schriber JR, Grimes K, et al. Granulocyte colony-stimulating factor "mobilized" peripheral blood progenitor cells accelerate granulocyte and platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Blood* 1993; 81: 2031-2035.
72. Bensinger W, Singer J, Appelbaum F, et al. Autologous transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant granulocyte stimulating factor. *Blood* 1993; 81: 3158-3163.
73. Teshima T, Harada M, Takamatsu Y, et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)-induced mobilization of circulating haemopoietic stem cells. *Br J Haematol* 1993; 84: 570-573.
74. Haas R, Ho AD, Bredthauer U, et al. Successful autologous transplantation of blood stem cells mobilized with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Exp Hematol* 1990; 18: 94-98.
75. Peters WP, Rosner G, Ross M, et al. Comparative effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on priming peripheral blood progenitor cells for use with autologous bone marrow after high-dose chemotherapy. *Blood* 1993; 81: 1709-1719.
76. Bishop MR, Anderson JR, Jackson JD et al. High-dose therapy and peripheral blood progenitor cell transplantation: effects of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the autograft. *Blood* 1994; 83: 610-616.

77. Sheridan WP, Begley CG, To LB, et al. Phase II study of autologous filgrastim (G-CSF)-mobilized peripheral blood progenitor cells to restore hemopoiesis after high-dose chemotherapy for lymphoid malignancies. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 105-111.
78. Dreger P, Haferlach T, Eckstein V, et al. G-CSF-mobilized peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: safety, kinetics of mobilization, and composition of graft. *Br J Haematol* 1994; 87: 609-613.
79. Zeller W, Gutensohn K, Stockschräger M, et al. Increase of mobilized CD34-positive peripheral blood progenitor cells in patients with Hodgkin's disease, non-Hodgkin's lymphoma and cancer of the testis. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 709-713.
80. Demuynck H, Delforge M, Verhoef G, et al. Comparative study of peripheral blood progenitor cell collection in patients with multiple myeloma after single-dose cyclophosphamide combined with rhGM-CSF or rhG-CSF. *Br J Haematol* 1993; 90: 384-392.
81. Kröger N, Zeller W, Hassan HT, et al. Schedule-dependency of granulocyte colony-stimulating factor in peripheral blood progenitor cell mobilization in breast cancer patients. *Blood* 1998; 91: 1828.
82. Watts MJ, Addison I, Long SG, et al. Crossover study of the haematological effects and pharmacokinetics of glycosylated and non-glycosylated G-CSF in healthy volunteers. *Br J Haematol* 1997; 98: 474-479.

83. Gianni AM, Siena S, Bregni M, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haemopoietic stem cells for autotransplantation. *Lancet* 1989; 2: 580-585.
84. Siena S, Bregni M, Brando B, et al. Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: Enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1989; 74: 1905-1914.
85. Craig JIO, Anthony RS, Stewart A, et al. Peripheral blood stem cell mobilization using high-dose cyclophosphamide and G-CSF in pretreated patients with lymphoma. *Br J Haematol* 1993; 85: 210-212.
86. Brugger W, Bross K, Frisch J, et al. Mobilization of peripheral blood progenitor cells by sequential administration of interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor following polychemotherapy with etoposide, ifosfamide and cisplatin. *Blood* 1992; 79: 1193-1200.
87. Huan SD, Hester J, Spitzer G, et al. Influence of mobilized peripheral blood cells on the hematopoietic recovery by autologous marrow and recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after high-dose cyclophosphamide, etoposide, and cisplatin. *Blood* 1992; 79: 3388-3393.
88. Elias AD, Ayash L, Anderson KC, et al. Mobilization of peripheral blood progenitor cells by chemotherapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for hematologic support after high-dose intensification for breast cancer. *Blood* 1992; 79: 3036-3044.

89. Fukuda M, Kojima S, Matsumoto K, et al. Autotransplantation of peripheral blood stem cells mobilized by chemotherapy and recombinant human G-CSF in childhood neuroblastoma and non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 1992; 80: 327-331.
90. Dreger P, Marquardt P, Haferlach T, et al. Effective mobilization of peripheral blood progenitor cells with "DexaBEAM" and G-CSF: timing of harvesting and composition of the leukapheresis product. *Br J Cancer* 1993; 68: 950-957.
91. Pettengell R, Testa NG, Swindell R, et al. Transplantation potential of hematopoietic cells released into the circulation during routine chemotherapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1993; 82: 2239-2248.
92. Kohno A, Takeyama K, Narabayashi M, et al. Low-dose granulocyte colony-stimulating factor enables the efficient collection of peripheral blood stem cells after disease-oriented, conventional-dose chemotherapy for breast cancer, malignant lymphoma and germ cell tumor. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 49-54.
93. Schwella N, Beyer J, Schwaner I, et al. Impact of preleukapheresis cell counts on collection results and correlation of progenitor-cell dose with engraftment after high-dose chemotherapy in patients with germ cell cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1114-1121.
94. Schwella N, Rick O, Meyer O, et al. Mobilization of peripheral blood progenitor cells by disease-specific chemotherapy in patients with soft tissue sarcoma. *Bone Marrow Transplant* 1998, 21: 863-868.

95. Schwella N, Huhn D. Mobilisation und Separation autologer Blutstammzellen. *Der Onkologe* 1998; 4: 639-648.
96. Craig JIO, Turner ML, Parker AC. Peripheral blood stem cell transplantation. *Blood Rev* 1992, 6: 59-67.
97. Harada M, Yoshida T, Ishino C, et al. Hematologic recovery following autologous and allogeneic bone marrow transplantation. *Exp Hematol* 1983; 11: 841-848.
98. Jagannath S, Dicke KA, Armitage JA, et al. High dose cyclophosphamide, carmustine, and etoposide and autologous bone marrow transplantation for relapsed Hodgkin's disease. *Ann Internal Med* 1986; 104: 163-168.
99. Spitzer G, Verma DS, Fisher R, et al. The myeloid progenitor cell – its value in predicting hematopoietic recovery after autologous bone marrow transplantation. *Blood* 1980; 55: 317-323.
100. Douay L, Gorin NC, Lemarie E, et al. Recovery of CFU-GM from cryopreserved marrow and in vivo evaluation after autologous bone marrow transplantation are predictive of engraftment. *Exp Hematol* 1986; 14: 358-365.
101. Rowley SD, Zuehlsdorf M, Braine HG, et al. CFU-GM content of bone marrow graft correlates with time to hematologic reconstitution following autologous bone marrow transplantation with 4-hydroperoxycyclophosphamide-purged bone marrow. *Blood* 1987; 70: 271-275.

102. Torres A, Alonso MC, Gomez-Villagram JL, et al. No influence of number of donor CFU-GM on granulocyte recovery in bone marrow transplantation for acute leukaemia. *Blut* 1985; 50: 89-94.
103. Williams SF, Bitran JD, Richards JM, et al. Peripheral blood-derived stem cell collections for use in autologous transplantation after high-dose chemotherapy: An alternative approach. *Bone Marrow Transplant* 1990; 5: 129-33.
104. Henon PR, Liang H, Beck-Wirth G, et al. Comparison of hematopoietic and immune recovery after autologous bone marrow or blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9: 285-291.
105. Shpall EJ, Jones RB, Bearman SI et al. Transplantation of enriched CD34-positive autologous marrow into breast cancer patients following high-dose chemotherapy: influence of CD34-positive peripheral-blood progenitors and growth factors on engraftment. *J Clin Oncol* 1994; 12: 28-36.
106. Bender JG, To LB, Williams S, Schwartzberg LS. Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *J Hematother* 1992; 1: 329-341.
107. Teshima T, Harada M, Takamatsu Y, et al. Cytotoxic drug and cytotoxic drug/G-CSF mobilization of peripheral blood stem cells and their use for autografting. *Bone Marrow Transplant* 1992; 10: 215-220.
108. Haas R, Möhle R, Frühauf S, et al. Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma. *Blood* 1994; 83: 3787-3794.

109. Schwartzberg L, Birch R, Blanco R, et al. Rapid and sustained hematopoietic reconstitution by peripheral blood stem cell infusion alone following high-dose chemotherapy. *Bone Marrow Transplant* 1993; 11: 369-374.
110. Schwella N, Siegert W, Beyer J, et al. Autografting with blood progenitor cells: predictive value of preapheresis blood cell counts on progenitor cell harvest and correlation of the reinfused cell dose with hematopoietic reconstitution. *Ann Hematol* 1995, 71: 227-234.
111. Schiller G, Vescio R, Freytes C, et al. Transplantation of CD34+ peripheral blood progenitor cells after high-dose chemotherapy for patients with advanced multiple myeloma. *Blood* 1995; 86: 390-397.
112. Hohaus S, Goldschmidt H, Ehrhardt R, Haas R. Successful autografting following myeloablative conditioning therapy with blood stem cells mobilized by chemo-therapy plus rhG-CSF. *Exp Hematol* 1993; 21: 508-514.
113. Weaver CH, Hazelton B, Birch R, et al. An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy. *Blood* 1995; 86: 3961-3969.
114. Kiss JE, Rybka WB, Winkelstein A, et al. Relationship of CD34+ cell dose to early and late hematopoiesis following autologous peripheral blood stem cell trans-plantation. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 303-310.
115. Einhorn L. Treatment of testicular cancer: a new and improved model. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1777-1781.

116. Fitzharris B, Kaye S, Saverymuttu S, et al. VP 16-213 as a single agent in advanced testicular tumors. *Eur J Cancer* 1980; 16: 1193-1197.
117. Wheeler B, Loehrer P, Williams S, et al. Ifosfamide in refractory male germ cell tumors. *J Clin Oncol* 1986; 4: 28-34.
118. Siegert W, Beyer J, Strohscheer I, et al. High-dose treatment with carboplatin, etoposide, and ifosfamide followed by autologous stem cell transplantation in relapsed or refractory germ cell cancer – A phase I/II study. *J Clin Oncol* 1994; 12: 1223-1231.
119. Nichols C, Tricot G, Williams SD, et al. Dose-intensive chemotherapy in refractory germ cell cancer: a phase I/II trial of high-dose carboplatin and etoposide with autologous bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1989; 7: 932-939.
120. Broun E, Nichols C, Turns M, et al. Early salvage therapy for germ cell cancer using high dose chemotherapy with autologous bone marrow support. *Cancer* 1994; 73: 1716-1720.
121. Bokemeyer C, Kuczyk M, Köhne H, et al. Treatment of testicular cancer and hematopoietic growth factors: Biological interactions, routine use and dose-intensive chemotherapy. *Ann Hematol* 1996; 72: 1-9.
122. Silvestri F, Fritsch G, Serke S, et al. Comparison of two monoclonal antibodies – 8G12 and QBEND10 – in detecting CD34+ cells circulating in the peripheral blood. *Eur J Lab Med* 1993; 1: 125-128.

123. Leibundgut K, Muff J, Hirt A, et al. Evaluation of the Fresenius cell separator AS104 for harvesting peripheral blood stem cells in pediatric patients. *Transfus Sci* 1994; 15: 93-99.
124. Padley D, Strauss RG, Weiland M, Randels MJ. Concurrent comparison of the COBE Spectra and Fenwal CS-3000 for the collection of peripheral blood mononuclear cells for autologous peripheral stem cell transplantation. *J Clin Apheresis* 1991; 6: 77-80.
125. Schwella N, Zimmermann R, Heuft HG, et al. Microbiologic contamination of peripheral blood stem cell autografts. *Vox Sang* 1994; 67: 32-35.
126. Fauser AA, Messner HA. Granuloerythropoietic colonies in human bone marrow, peripheral blood and cord blood. *Blood* 1978; 52: 1243-1248.
127. Nademanee A, Sniecinski I, Schmidt GM, et al. High-dose therapy followed by autologous peripheral-blood stem-cell transplantation for patients with Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma using unprimed and granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral-blood stem cells. *J Clin Oncol* 1994; 12: 2176-2186.
128. Martin-Murea S, Voso MT, Hohaus S, et al. The dose of granulocyte colony-stimulating factor administered following cytotoxic chemotherapy is not related to the rebound level of circulating CD34+ haemopoietic progenitor cells during marrow recovery. *Br J Haematol* 1998; 101: 582-585.

129. Demirer T, Buckner CD, Storer B, et al. Effect of different chemotherapy regimens on peripheral-blood stem-cell collections in patients with breast cancer receiving granulocyte colony-stimulating factor. *J Clin Oncol* 1997; 15: 684-690.
130. Elliott C, Samson DM, Armitage S, et al. When to harvest peripheral-blood stem cells after mobilization therapy: Prediction of CD34-positive cell yield by preceding day CD34-positive concentration in peripheral blood. *J Clin Oncol* 1996; 14: 970-973.
131. Möhle R, Murea S, Pförsich M, et al. Estimation of the progenitor cell yield in a leukapheresis product by previous measurement of CD34+ cells in peripheral blood. *Vox Sang* 1996; 71: 90-96.
132. Serke S, Watts M, Meldgaard Knudsen L, et al. In-vitro clonogenicity of mobilized peripheral blood CD34-expressing cells: inverse correlation to both relative and absolute numbers of CD34-expressing cells. *Br J Haematol* 1996; 95: 234-240.
133. Bensinger WI, Longin K, Appelbaum F, et al: 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* 1994; 87: 825-831.
134. Chabannon C, Le Coroller AG, Faucher C, et al. Patient condition affects the collection of peripheral blood progenitors after priming with recombinant granulocyte colony-stimulating factor. *J Hematother* 1995; 4: 171-179.

135. Goldschmidt H, Hegenbart U, Wallmeier M, et al. Factors influencing collection of peripheral blood progenitor cells following high-dose cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 1997; 98: 736-744.
136. Dreger P, Klöss M, Petersen B, et al. Autologous progenitor cell transplantation: Prior exposure to stem cell-toxic drugs determines yield and engraftment of peripheral blood progenitor cell but not of bone marrow grafts. *Blood* 1995; 86: 3970-3978.
137. Weaver CH, Schwartzberg LS, Birch R, et al. Collection of peripheral blood progenitor cells after the administration of cyclophosphamide, etoposide, and granulocyte colony-stimulating factor: an analysis of 497 patients. *Transfusion* 1997; 37: 896-903.
138. Copelan EA, Ceselski SK, Ezzone SA, et al. Mobilization of peripheral-blood progenitor cells with high-dose etoposide and granulocyte colony-stimulating factor in patients with breast cancer, non Hodgkin's lymphoma, and Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 1997; 15: 759-765.
139. Blackett NM, Adams K. Cell proliferation and the action of cytotoxic agents on haemopoietic tissue. *Br J Haematol* 1972; 23: 751-758.
140. Trainor KJ, Morley AA. Screening of cytotoxic drugs for residual bone marrow damage. *J Natl Cancer Inst* 1976; 57: 1237-1239.

141. Neben S, Hemman S, Montgomery M, et al. Haematopoietic stem cell deficit of transplanted bone marrow previously exposed to cytotoxic agents. *Exp Hematol* 1993; 21: 156-162.
142. Shepherd KM, Charles P, Sage RE, et al. Mobilization of haemopoietic stem cells by cyclophosphamide into the peripheral blood of patients with haematological malignancies. *Clin Lab Haematol* 1991; 13: 25-32.
143. Tarella C, Boccardo M, Omede P, et al. Role of chemotherapy and GM-CSF on hemopoietic progenitor cell mobilization in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 1993; 11: 271-277.
144. Bensinger W, Appelbaum F, Rowley S, et al. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2547-2555.
145. Watts MJ, Sullivan AM, Jamieson E, et al. Progenitor-cell mobilization after low dose cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor: An analysis of progenitor-cell quantity and quality and factors predicting for these parameters in 101 pretreated patients with malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 1997; 15: 535-546.
146. Drake M, Ranaghan L, Morris TCM, et al. Analysis of the effect of prior therapy on progenitor cell yield: use of a chemotherapy scoring system. *Br J Haematol* 1997; 98: 745-749.

147. Passos-Coelho JL, Braine HG, Davis JM, et al. Predictive factors for peripheral blood progenitor-cell collections using a single large-volume leukapheresis after cyclophosphamide and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mobilization. *J Clin Oncol* 1995; 13: 705-714.
148. Cantin G, Marchand-Laroche D, Bouchard MM, Leblond PF. Blood-derived stem cell collection in acute non-lymphoblastic leukaemia: predictive factors for a good yield. *Exp Hematol* 1989; 17: 991-996.
149. Reid CDL, Kirk A, Muir J, Chanarin I. The recovery of circulating progenitor cells after chemotherapy in AML and ALL and its relation to the rate of bone marrow regeneration after aplasia. *Br J Haematol* 1989; 72: 21-27.
150. Olivieri A, Offidani M, Ciniero L, et al. Optimization of the yield of PBSC for autotransplantation mobilized by high-dose chemotherapy and G-CSF: proposal for a mathematical model. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 273-278.
151. Webb IJ, Eickhoff CE, Elias AD, et al. Kinetics of peripheral blood mononuclear cell mobilization with chemotherapy and/or granulocyte colony-stimulating factor: implications for timing and yield of hematopoietic progenitor cell collections. *Transfusion* 1996; 36: 160-167.
152. Hillyer CD, Tiegerman KO, Berkman EM. Increase in circulating colony-forming units granulocyte-macrophage during large-volume leukapheresis: evaluation of a new cell separator. *Transfusion* 1991; 31: 327-332.

153. Comenzo RL, Vosburgh E, Weintraub LR, et al. Collection of mobilized blood progenitor cells for hematopoietic rescue by large-volume leukapheresis. *Transfusion* 1995; 35: 493-497.
154. Scott MA, Ager S, Jestice HK, et al. Failure to mobilise and harvest PBPC does not necessarily preclude the use of high-dose therapy and autologous stem cell rescue. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 487-488.
155. Benjamin RJ, Linsley L, Fountain D, et al. Preapheresis peripheral blood CD34+ mononuclear cell counts as predictors of progenitor cell yield. *Transfusion* 1997; 37: 79-85.
156. Papadopoulos KP, Ayello J, Tugulea S, et al. Harvest quality and factors affecting collection and engraftment of CD34+ cells in patients with breast cancer scheduled for high-dose chemotherapy and peripheral blood progenitor cell support. *J Hematother* 1997; 6: 61-68.
157. Mitterer M, Hirber J, Gentilini I, et al. Target value tailored (TVT) apheresis approach for blood progenitor cell collection after high-dose chemotherapy and rh G-CSF. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18: 611-617.
158. Pérez-Simón JA, Caballero MD, Corral M, et al. Minimal number of circulating CD34+ cells to ensure successful leukapheresis and engraftment in autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Transfusion* 1998; 38: 385-391.

159. Ketterer N, Salles G, Raba M, et al. High CD34+ cell counts decrease hematologic toxicity of autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Blood* 1998; 91: 3148-3155.
160. Remes K, Matinlauri I, Grenman S, et al. Daily measurements of blood CD34+ cells after stem cell mobilization predict stem cell yield and posttransplant hematopoietic recovery. *J Hematother* 1997; 6: 13-19.
161. Zimmerman TM, Lee WJ, Bender JG, et al. Quantitative CD34 analysis may be used to guide peripheral blood stem cell harvests. *Bone Marrow Transplant* 1995; 9: 439-444.

## 7. Danksagung

Herrn Professor Dr. Dieter Huhn danke ich für die Anleitung während meiner gesamten internistischen und wissenschaftlichen Ausbildung. Ohne seine unermüdliche Förderung und Unterstützung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Professor Dr. Wolfgang Siegert gebührt mein Dank für die Begleitung meiner ersten wissenschaftlichen Schritte auf dem Gebiet der Hochdosistherapie und Knochenmark- bzw. Blutstammzelltransplantation, sowie für zahlreiche anregende und fruchtbare Diskussionen.

Herrn Professor Dr. Stefan Serke danke ich für die großzügige Überlassung der durchflußzytometrischen Daten der CD34-Analysen.

Meinen Kollegen Dr. Jörg Beyer und Dr. Oliver Rick möchte ich auf diesem Wege für die freundschaftliche und vertrauensvolle Zusammenarbeit danken.

Herrn Professor Dr. Abdulgabar Salama danke ich für die Anleitung auf dem Gebiet der Transfusionsmedizin und für die Möglichkeit der Mitarbeit im Stammzell-Labor.

Den Mitarbeiterinnen des Stammzell-Labors, Frau Margit Paulus und Frau Ira Trehkopf, möchte ich ebenfalls meinen aufrichtigen Dank aussprechen.