

# Autologe Stammzelltransplantation



Dr. Erdwine Klinker



Dr. Florian Weißinger



Organisation der Forums: Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, Universität Würzburg (Professor Dr. Markus Böck).

Stammzellforschung und Stammzelltherapie ist ein kontrovers diskutiertes Thema. Die hauptsächlich ethischen Bedenken richten sich gegen die wissenschaftliche Verwendung und therapeutische Anwendung von embryonalen Stammzellen, deren Totipotenz eine Differenzierungsfähigkeit in sämtliche Körperzellen, inklusive Zellen der Keimbahn, ermöglicht. Von diesen Zellen sind die gewebespezifischen, determinierten Stammzellen abzugrenzen, die in ihrer Pluri- oder Multipotenz in Abhängigkeit vom jeweiligen Differenzierungsstadium eingeschränkt sind. So sind hämatopoetische Stammzellen (HSZ), mit denen seit mehr als 40 Jahren Patienten im Rahmen von Knochenmarktransplantationen behandelt werden, zur Selbsterneuerung und Differenzierung befähigt und stellen das Reservoir dar, aus dem sich lebenslang Zellgenerationen der Erythropoese, Leukopoese und Thrombopoese entwickeln.

## Therapieprinzip

Bei der autologen Stammzelltransplantation werden die Stammzellen dem Patienten selbst entnommen und nach einer aggressiven Therapie wieder reinfundiert. Sie ermöglichen daher eine Intensivierung der zytostatischen Therapie (eventuell in Kombination mit einer Radiatio) bis in den Bereich der irreversiblen Knochenmarkschädigung. Die Aufgabe der HSZ ist bei diesem Therapieprinzip der maximalen Dosissteigerung der Ersatz der hämatopoetischen Funktion.

## Möglichkeiten der Gewinnung autologer Stammzellen

### Knochenmarkpunktion

Bis Anfang der Neunzigerjahre war das Knochenmark die einzige Quelle für HSZ sowohl für die autologe wie auch für die allogene Transplantation. Die Stammzellen werden hierbei unter Vollnarkose durch multiple Punktionen des Beckenkamms in ca. 500 bis 1500 ml Knochenmarkblut gewonnen und anschließend kryokonserviert.

## Periphere Stammzellapherese

Die heutzutage bevorzugte Methode zur Gewinnung autologer Stammzellen ist jedoch die so genannte periphere Stammzell-(PBSZ-)apherese nach geeigneter Mobilisierungstherapie. Stammzellpräparate, die mittels dieser Methode vom Patienten in der Phase der kompletten Remission gewonnen werden, enthalten im Vergleich zum Knochenmark neben einer erhöhten Anzahl der CD34 positiven unreifen Progenitorzellen auch ein Vielfaches an Gesamtleukozyten sowie immunkompetenten Lymphozyten. So begünstigen sie in der Anwendung nach einer Hochdosistherapie klinisch eine schnellere hämatopoetische Rekonstitution (innerhalb von acht bis 14 Tagen nach Reinfusion) und reduzieren die Transfusionsbedürftigkeit und die Krankenhausliegezeit der Patienten (1).

## Gewinnung von Nabelschnurblut

Die Gewinnung von Stammzellen aus Nabelschnurblut ist grundsätzlich ebenfalls möglich, allerdings mit einer wesentlich geringeren Ausbeute an CD 34+ Zellen. Die Nutzung dieser Quelle ist nach bisherigen medizinischen Erkenntnissen in der Regel nur für allogene Transplantationen, vor allem im Kindesalter, sinnvoll.

## Prinzip der Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark

Da unter physiologischen Bedingungen im peripheren Blut nur sehr geringe Mengen

HSZ zirkulieren, setzt das Verfahren der PBSZ-Apherese eine gesteigerte Freisetzung aus dem Knochenmark voraus. Durch Kombination einer nicht-stammzelltoxischen konventionellen Chemotherapie mit der anschließenden Gabe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (zum Beispiel G-CSF = Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) in der Induktionsphase (vergleiche Abbildung 1) wird ein Proliferationsreiz auf das Knochenmark gesetzt, der eine maximale Mobilisierung der Stammzellen in die Zirkulation ermöglicht (2, 3).

Vor Apherese wird eine Konzentration von mindestens  $10/\mu\text{l}$  CD34+ Zellen im peripheren Blut angestrebt, die erforderliche Anzahl für ein sicheres Transplantat liegt bei minimal  $2 \times 10^6/\text{kgKG}$ .

## Ablauf

Den Ablauf der Hochdosistherapie mit autologer peripherer Stammzelltransplantation (PBSZT) zeigt schematisiert Abbildung 1. Nach der Indikationsstellung zur autologen Stammzelltransplantation steht meist die konventionell dosierte Chemotherapie (Induktionstherapie = grün) am Anfang des Behandlungskonzepts. Sie hat zur Aufgabe die Tumorzellmasse zu reduzieren, wodurch einerseits die Effizienz der nachfolgenden Hochdosistherapie auf den Tumor verbessert wird und andererseits auch ein geringeres Ri-

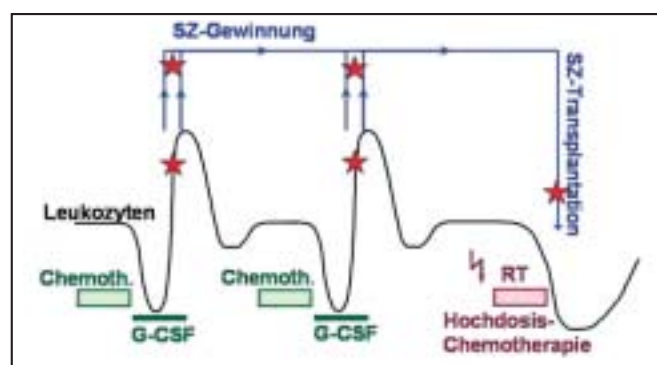


Abbildung 1: Schematisierter Ablauf der autologen Stammzelltransplantation mit Zellen, die aus dem peripheren Blut mobilisiert werden (auto-PBSZT).

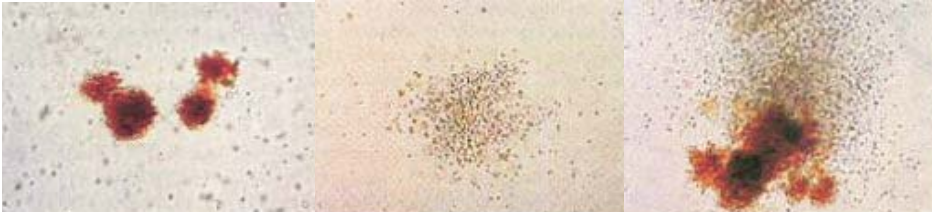


Abbildung 2: Zellen aus dem Stammzellseparat werden in semisolidem Medium aus Methylzellulose und Wachstumsfaktor-haltigem Überstand stimulierter Stromazellen über 14 Tage bei 37 °C inkubiert. Aus bereits determinierten Einzelzellen bilden sich spezifische Kolonien der Erythropoese (A: BFU-E = burst-forming-unit erythrocyte), der Granulo-/Monopoese (B: CFU-GM = colony-forming-unit granulocyte monocyte) und aus unreiferen Zellen (C: CFU-GEMM = colony-forming-unit granulocyte erythrocyte monocyte macrophage).

siko der Tumorzellkontamination des Transplantats erreicht wird („*in vivo* purging“). Es folgt anschließend die Gabe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (G-CSF, 10µg/kgKG tgl. s.c.) zur Steigerung der Mobilisierungsrate der Stammzellen aus dem Knochenmark (Bestimmung mittels Durchflusszytometrie und colony-assays zu den mit rotem Stern bezeichneten Zeitpunkten ⇒ Qualitätssicherung siehe unten). Die Stammzellen werden aus dem Blut mittels geeigneter Zellseparatoren gewonnen (⇒ Stammzellapherese siehe unten) und müssen für die spätere autologe Retransfusion eingefroren und tiefgekühlt bei -80 °C oder kälter gelagert werden (⇒ Kryokonservierung). Die Retransfusion erfolgt nach Applikation der Hochdosistherapie (Konditionierung = rot), wobei ein Abstand eingehalten werden muss, der eine toxische Wirkung der Zytostatika auf die transplantierten Zellen ausschließt (in Abhängigkeit von der biologischen Halbwertszeit der Zytostatika 24 bis 72 Stunden ⇒ Transplantation). Die Dauer der anschließenden Aplasiaphase ist abhängig von der Anzahl und Qualität der transfundierten Stammzellen. Anzustreben ist eine Zahl von mindestens  $2,0 \times 10^6$  Stammzellen pro kg KG. Höhere Zahlen scheinen jedoch vor allem die Zeitdauer bis zur Erholung der Thrombozyten zu verkürzen (4). Eine Hochdosistherapie wird damit berechenbar und ist durch die relativ kurze Phase der Aplasie von meist sieben bis zehn Tagen nicht als Hochrisikotherapie bezüglich Infektionen einzustufen. Die Letalität liegt in Zentren mit entsprechender Erfahrung bei 2 bis 4 %. Die wesentlichen akuten Nebenwirkungen sind bedingt durch die Konditionierung und umfassen

- Schleimhauttoxizitäten mit zum Teil schweren Mukosiden, die eine parenterale Ernährung erforderlich machen können;
- Infektionen bis zur Sepsis, die meist eine frühzeitige, auch empirische antibiotische Therapie erfordern;
- Anämie und Blutungsneigung durch Thrombopenie, die eine Substitution von Blutprodukten erfordern (eine mögliche Reaktion der enthaltenen Fremd-Lymphozyten gegen den Empfänger – Graft versus Host Reaktion, GvHR – wird durch eine Bestrahlung der Blutprodukte vermieden).

⇒ **Qualitätssicherung**

Hämatopoetische Stammzellpräparate sind Arzneimittel im Sinne des § 2 Absatz 1 AMG (5). Dementsprechend sind bei Gewinnung und Präparation, Lagerung und Transport sowie bei ihrer Anwendung die erforderlichen personellen, apparativen, arbeitstechnischen und räumlichen Vorgaben, die sich daraus und aus weiteren relevanten Regelwerken ergeben, zu berücksichtigen (6, 7, 8, 9).

Vor diesem Hintergrund kommt einer qualitätsgesicherten Herstellung eine wesentliche Bedeutung zu. Alle qualitätskritischen Präparationsschritte müssen mittels geeigneter Kontrollen überprüft und die Qualität der Stammzellen im Endprodukt getestet werden. Hierfür wird mittels Fluoreszenz-markierter Anti-CD34-Antikörper in der Durchflusszytometrie die Gesamtzahl der CD34+ Stammzellen ermittelt, mit Hilfe eines Vitalfarbstoffs deren Viabilität und in Klonogenitätstesten ihre Fähigkeit zur In-vitro-Koloniebildung (CFU-GM, BFU-E) untersucht (vergleiche Abbildung 2).

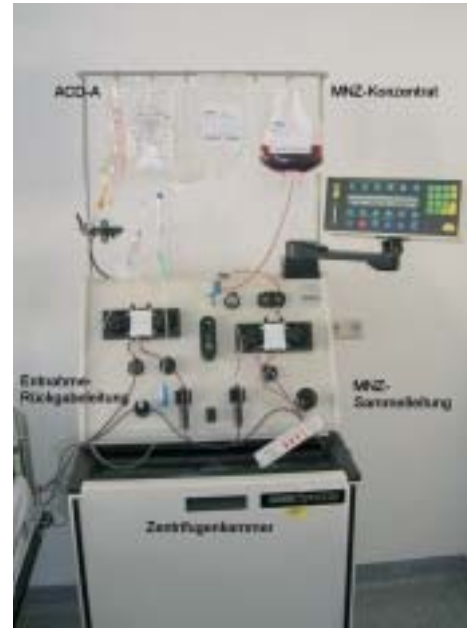


Abbildung 3: Zellseparator COBE Spectra/Gambro. An diesem Gerät wird in einem kontinuierlichen 2-Nadel-Verfahren über eine Entnahme- und Rückgabeleitung ein extrakorporaler Kreislauf aufgebaut. Mittels Zentrifugationstechnik ist die Separation, Anreicherung und Gewinnung von MNZ möglich.

⇒ **Stammzellapherese**

Zur Gewinnung der PBSZ stehen so genannte Zellseparatoren (Abbildung 3) zur Verfügung, deren Trennmechanismus auf einer Differenzialzentrifugation beruht. In einem extrakorporalen, geschlossenen System erfolgt die Auftrennung und Schichtung der verschiedenen Blutkomponenten in einer Zentrifugenkammer entsprechend ihrer spezifischen Dichte (von außen nach innen: Erythrozyten – granulozytäre Leukozyten – mononukleäre Zellen/MNZ – Thrombozyten – Plasma). Stammzellen reichern sich aufgrund ihrer morphologischen und physikalischen Ähnlichkeit mit den Lymphozyten in der Schicht der MNZ an und können zusammen mit diesen von den übrigen Blutbestandteilen separiert und gesammelt werden.

Sobald der Patient nach der Induktionschemotherapie den Leukozytennadir durchschritten und die notwendigen Voraussetzungen erfüllt, kann mit der Stammzellapherese begonnen werden (Tabelle 1).

Über vorzugsweise peripher-venöse Gefäßzüge, zum Beispiel großkalibrige (16-18G) Dialysekanülen, werden in der Regel während einer Behandlungszeit von drei bis fünf Stunden insgesamt 12 000 bis 18 000 ml Blut extrakorporal prozessiert und nach dem oben

klinisch/laborchemisch	organisatorisch/formal
CD34+ Zellen in der Regel >10/µl	Aufklärung des Patienten erfolgt (Aphereseverfahren, Präparation, Kryokonservierung, Lagerung sowie Möglichkeit der Beschädigung oder des Verlusts der gewonnenen Produkte)
Thrombozyten in der Regel > 50 x 10 <sup>3</sup> /µl, ggf. Substitution	Vereinbarung über Dauer der Lagerzeit
Blutgruppenbefund	Schriftliche Einverständniserklärung
Infektionsmarker	
Apheresetauglichkeit bescheinigt	
Ggf. Anlage eines ZVK (doppellumiger Shaldon-Katheter)	

Tabelle 1: Voraussetzungen zur Stammzellapherese (entsprechend der Richtlinien zur Transplantation peripherer Blutstammzellen).

Allgemeine Hämapherese- NW/Risiken:	Hypotone Kreislaufreaktion, Zitratreaktion, Gerinnselbildung, Hämolyse, Luftembolie, Probleme mit Gefäßzugängen
Blutungsrisiko:	Verfahrensbedingt durch Antikoagulation, vor allem bei Thrombozytopenie
Katheterkomplikationen:	Thrombose, Infektionen, Sepsis

Tabelle 2: Mögliche Risiken und Nebenwirkungen bei der Gewinnung autologer Stammzellen.

Präparationsschritte	Maßnahmen	Qualitätskontrolle
Gegebenenfalls Einengen des Ausgangspräparats (abhängig von der Zellkonzentration)	Zentrifugation, Abquetschen des Plasmaüberstands (geschlossenes System)	Anzahl Gesamtleukozyten, CD34+ Zellen, Viabilität, CFU-GM
Portionierung des Präperates Vorverdünnung des Gefrierschutzmittels (DMSO) Zugabe des DMSO zum Präparat (10 % Endkonzentration)	Arbeiten im offenen System unter Reinraum- bedingungen	Anzahl Gesamtleukozyten, CD34+ Zellen, Viabilität, CFU-GM, Sterilität
Kontrolliertes Einfrieren		

Tabelle 3: Präparationsschritte zur Kryokonservierung.

genannten Prinzip 200 bis 300 ml MNZ-Konzentrat gewonnen. Diese Prozedur kann, falls notwendig, an bis zu vier Tagen hintereinander durchgeführt werden.

Während der gesamten Entnahmeprozedur wird der Patient kontinuierlich bezüglich der Herzkreislaufparameter überwacht. Zur Prophylaxe von Zitratnebenwirkungen hat sich die Gabe von zum Beispiel 5 % Calciumgluconat als Dauerinfusion in einer Dosierung von 20 bis 25 ml/h bewährt.

Die PBSZ-Apherese ist im Allgemeinen ein sicheres Verfahren, bei dem nur in Ausnahmefällen ernsthafte Nebenwirkungen oder Komplikationen auftreten (Tabelle 2).

### ⇒ Präparation, Kryokonservierung, Lagerung

Stammzellen können ohne weitere Zusätze bei 4 °C maximal 72 Stunden zwischengelagert werden, danach ist nach Zusatz eines geeigneten Gefrierschutzmittels (zum Beispiel Dimethylsulfoxid, DMSO) eine Kryokonservierung in flüssigem oder gasförmigem Stickstoff erforderlich.

Zur Reduktion einer potenziellen Tumorzellkontamination können zuvor unter bestimmten Voraussetzungen verschiedene In-vitro-Manipulationen der Stammzellpräparate zur Anreicherung („Purging“) der CD34+ Zellen durchgeführt werden (10). Ein hoher Reinheitsgrad von > 90 % kann durch eine Selektion der CD34+ Zellen über CD34-Antikörpergekoppelte „beads“ erzielt werden

(„Positivselektion“), die an magnetische Säulen binden. Allerdings ist hierbei ein Verlustanteil von mindestens 30 % der Ausgangszellen zu berücksichtigen. Bei der so genannten „Negativselektion“ werden nach gleichem Prinzip Tumorzellen mit charakteristischen Oberflächenmerkmalen eliminiert. Eine Senkung der Rezidivrate durch diese Methoden ist noch nicht gesichert.

Die Präparation zur Kryokonservierung muss unter kontrolliert sterilen Bedingungen im Reinraum nach GMP (Gute Herstellungs-Praxis)-Standard erfolgen (Tabelle 3).

Nach der Zugabe der Gefrierschutzlösung wird das PBSZ-Endprodukt zügig nach einem kontrollierten Einfrierprogramm in der Gasphase von flüssigem Stickstoff tiefgefroren und danach in ebenfalls stickstoffgekühlte Lagerbehälter überführt (Lagertemperatur in der Gasphase von flüssigem Stickstoff ca. -150 °C). Unter diesen Bedingungen kann in der Regel eine mehrjährige Haltbarkeit der Präparate angenommen werden.

### ⇒ Transplantation

Die Retransfusion (=Transplantation) der autologen Stammzellen erfolgt nach der Applikation der Hochdosistherapie in einem zeitlichen Intervall von 24 bis 72 Stunden. Die Einzelpräparate, die insgesamt eine Mindestanzahl CD34+ Zellen von 2 x 10<sup>6</sup>/kgKG des Patienten enthalten müssen, werden erst am Patientenbett mit einem hierzu geeigneten Gerät unter kontrollierten Bedingungen aufgetaut und bei einer Temperatur von ca. 4 °C über einen zentralvenösen Venenkatheter transfundiert.

Schwere Komplikationen treten in der Regel nicht auf. In Abhängigkeit von der enthaltenen DMSO-Dosis kommt es jedoch häufiger zu Übelkeit oder Erbrechen, Husten sowie unangenehmen Geschmackssensationen. Gelegentlich auftretende Bradykardien sind unter Umständen durch die Kälte des Transplantats bei Retransfusion zurückzuführen.

*Das Literaturverzeichnis kann bei den Verfassern angefordert oder im Internet unter [www.blaek.de](http://www.blaek.de) (Ärzteblatt/Literaturhinweise) abgerufen werden.*

#### *Anschrift der Verfasser:*

*Dr. Erdwine Klinker, Oberärztin der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universität Würzburg, Josef-Schneider-Straße 2, 97080 Würzburg*

*Dr. Florian Weisinger, Oberarzt der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg, Klinikstraße 6 - 8, 97070 Würzburg*