

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Zentrum für Onkologie, Interdisziplinäre Klinik für Stammzelltransplantation

Direktor der Klinik: Prof. Dr. med. Nicolaus Kröger

## **Anwendung des CD34<sup>+</sup> selektierten Stammzellboostes bei Patienten mit schlechter Transplantatfunktion („poor graft function“) nach allogener Stammzelltransplantation.**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin /Zahnmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Evgeny Klyuchnikov aus St. Petersburg

Hamburg 2019

**(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)**

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 14.05.2019**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Nicolaus Kröger**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Ingo Müller**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Originalartikel</b> .....	- 4 -
<b>2. Einleitung</b> .....	- 9 -
<b>2.1 Allogene Stammzelltransplantation (allo-SZT)</b> .....	- 9 -
<b>2.2 Schlechte Transplantatfunktion („poor graft function“)</b> .....	- 13 -
<b>3. Zusammenfassung der Arbeit</b> .....	- 15 -
<b>3.1 Ziel der Arbeit</b> .....	- 15 -
<b>3.2 Patienten</b> .....	- 15 -
<b>3.3 Definitionen</b> .....	- 15 -
<b>3.3.1 Das Engraftment:</b> .....	- 15 -
<b>3.3.2 Schlechte Transplantatfunktion</b> .....	- 16 -
<b>3.4 CD34<sup>+</sup>-selektierte SZBs</b> .....	- 16 -
<b>3.5 Folgende Faktoren wurden in Bezug auf Ansprechrate und Inzidenz der GvHD untersucht:</b> .....	- 16 -
<b>3.6 Resultate</b> .....	- 17 -
<b>3.6.1 Ansprechen</b> .....	- 17 -
<b>3.6.2 Faktoren, das Ansprechen beeinflussen</b> .....	- 17 -
<b>3.6.3 Spender-gegen-Wirt Reaktion (GvHD)</b> .....	- 17 -
<b>3.6.4 Faktoren, die Inzidenz der GvHD beeinflussten</b> .....	- 17 -
<b>3.6.5 Überleben</b> .....	- 18 -
<b>4. Diskussion</b> .....	- 18 -
<b>5. Schlußfolgerungen:</b> .....	- 20 -
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	- 21 -
<b>7. Zusammenfassung – Summary</b> .....	- 27 -
<b>8. Erklärung der Eigenanteils an der Publikation</b> .....	- 28 -
<b>9. Danksagung.</b> .....	- 29 -
<b>9. Lebenslauf</b> .....	- 30 -
<b>10. Eidesstattliche Versicherung</b> .....	- 30 -



# CD34<sup>+</sup>-Selected Stem Cell Boost without Further Conditioning for Poor Graft Function after Allogeneic Stem Cell Transplantation in Patients with Hematological Malignancies

Evgeny Klyuchnikov<sup>1</sup>, Jean El-Cheikh<sup>2</sup>, Andreas Sputtek<sup>3</sup>, Michael Lioznov<sup>1</sup>, Boris Calmels<sup>2</sup>, Sabine Furst<sup>2</sup>, Christian Chabannon<sup>2</sup>, Roberto Crocchiolo<sup>2</sup>, Claude Lemarié<sup>2</sup>, Catherine Faucher<sup>2</sup>, Ulrike Bacher<sup>1</sup>, Haefaa Alchalby<sup>1</sup>, Thomas Stübig<sup>1</sup>, Christine Wolschke<sup>1</sup>, Francis Ayuk<sup>1</sup>, Marie-Luise Reckhaus<sup>3</sup>, Didier Blaise<sup>2</sup>, Nicolaus Kröger<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department for Stem Cell Transplantation, University Cancer Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

<sup>2</sup> Department for Stem Cell Transplantation, Institut Paoli Calmettes, Marseille, France

<sup>3</sup> Institute for Transfusion Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

## Article history:

Received 7 May 2013

Accepted 30 November 2013

## Key Words:

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT)  
Poor graft function  
CD34<sup>+</sup>-selected cells  
Stem cell boost

## A B S T R A C T

We retrospectively analyzed outcomes of a CD34<sup>+</sup>-selected stem cell boost (SCB) without prior conditioning in 32 patients (male/22; median age of 54 years; range, 20 to 69) with poor graft function, defined as neutrophils  $\leq 1.5 \times 10^9/L$ , and/or platelets  $\leq 30 \times 10^9/L$ , and/or hemoglobin  $\leq 8.5$  g/dL. The median interval between stem cell transplantation and SCB was 5 months (range, 2 to 228). The median number of CD34<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> cells were  $3.4 \times 10^6/kg$  (.96 to 8.30) and  $9 \times 10^3/kg$  body weight (range, 2 to 70), respectively. Hematological improvement was observed in 81% of patients and noted after a median of 30 days (range, 14 to 120) after SCB. The recipients of related grafts responded faster than recipients of unrelated grafts (20 versus 30 days,  $P = .04$ ). The cumulative incidence of acute (grade II to IV) and chronic graft-versus-host disease (GVHD) after SCB was 17% and 26%, respectively. Patients with acute GVHD received a higher median CD3<sup>+</sup> cell dose. The 2-year probability of overall survival was 45%. We suggest that SCB represents an effective approach to improve poor graft function post transplantation, but optimal timing of SCB administration, anti-infective, and GVHD prophylaxis needs further evaluation.

© 2014 American Society for Blood and Marrow Transplantation.

## INTRODUCTION

Poor graft function (PGF) is a relatively rare post-transplantation complication associated with infections, bleeding, and secondary iron overload due to increased transfusions. There are various therapeutic approaches that potentially could improve PGF, such as stimulation of the already transplanted stem cells (eg, use of growth factors [1,2]), or administration of new stem cells from same donor (eg, a second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [HSCT] [3–5], or use of unmanipulated [6,7] or CD34<sup>+</sup>-selected stem cell boost [SCB] [8–11]).

The stimulation of the already transplanted stem cells by the use of myeloid growth factors was found to increase the production of neutrophils, but, on the other hand, to delay the platelet recovery, and moreover was associated with increased acute (a) and chronic (c) graft-versus-host disease (GVHD) rates [2]. In addition, the safety of the long-term use of growth factors remains unclear [12,13]. Further, for

patients with persisting thrombocytopenia, the use of thrombopoietin receptor agonists has not been tested in the setting of allogeneic HSCT. Thus, the use of growth factors represents a temporary approach that is unable to solve the cause of PGF. The stimulation of transplanted stem cells could also be achieved by modulation of the microenvironment of the stem cell niche. In this setting, the use of mesenchymal stem cells could also be a possible option to improve PGF, as their positive effect on engraftment had been shown [14–16].

Transplantation of additional stem cells could be performed as a regrafting after administration of preparative regimen or as an administration of stem cells graft without conditioning from the same donor. In general, regrafting after a preparative conditioning can successfully improve PGF with response rates of 66% to 100%. However, because of the high GVHD rate (40% to 60%), infectious complications, and consequently increased nonrelapse mortality (NRM) (50% to 60%), the overall survival (OS) after such approach is poor (20% to 35%) [3–5]. The leading causes of death after second transplantation were severe infections (44%) [3]. The first attempt to improve survival by reducing the NRM was made by Remberger et al. [6], who administered an unmanipulated SCB without conditioning in 16 patients with PGF. The improvement of hematopoiesis was achieved in majority of the patients resulting in a 3-years OS rate of 43%. However,

*Financial disclosure:* See Acknowledgments on page 386.

\* Correspondence and reprint requests: Nicolaus Kröger, MD, Department for Stem Cell Transplantation, University Cancer Center, University of Hamburg, Martinistrasse, 52, 20246, Hamburg, Germany.

E-mail address: [n.kroeger@uke.de](mailto:n.kroeger@uke.de) (N. Kröger).

1083-8791/\$ – see front matter © 2014 American Society for Blood and Marrow Transplantation.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2013.11.034>

high rates of aGVHD (31%) and cGVHD (50%) were reported. Min et al. [7] administered an unmanipulated SCB to 11 patients without prior conditioning and observed a favorable 3-year OS of 71% with a GVHD rate of 30%. Taking into account the fact that the persistence of T cells in graft might be associated with an increased GVHD rate, the use of a CD34 positive–selected SCB was suggested [8–11]. In our previous studies on 11 patients, we reported a possibility of improving PGF without development of GVHD by using a CD34 positive–selected SCB [9–11]. Here, we performed a retrospective analysis of a group of 32 PGF patients (including the 11 previous patients) after allogeneic HSCT to evaluate the safety, efficacy, and survival outcomes after the administration of the CD34<sup>+</sup> SCB.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients

Patients' characteristics are summarized in Table 1. A total of 32 patients with PGF received a CD34<sup>+</sup> SCB of peripheral blood stem cells from 2002 to 2011 at the Department for Stem Cell Transplantation of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany and the Department for Stem Cell Transplantation of the Institut Paoli Calmettes, Marseille, France, without additional conditioning. Almost one half of the patients in this cohort had a diagnosis of primary myelofibrosis (n = 14, 44%) and underwent transplantation with major ABO incompatibility. All patients gave written informed consent. The study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. A total of 12 of 32 (38%) patients required regular transfusions of blood products (erythrocyte and platelet concentrates) at least every month before allogeneic HSCT. At the time of the SCB administration, no patient received immunosuppressive medications and had full donor chimerism. The median neutrophil count at the time of the boost administration was  $1.1 \times 10^9/L$  (range, .2 to 1.2), the median platelet count was  $20 \times 10^9/L$  (range, 8 to 120), and the median hemoglobin concentration was 8.3 g/dL (range, 7.6 to 11.0).

### Definitions

Engraftment of neutrophils was defined as the first of 3 consecutive days when the absolute neutrophil count was  $\geq 5 \times 10^9/L$  without granulocyte colony-stimulating factor (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  body weight [b.w.]) stimulation. Engraftment of platelets was defined as the first of 3 consecutive days when the platelet count was  $\geq 20 \times 10^9/L$ , independent from platelet substitution.

PGF was defined by cytopenia in at least 2 hematopoietic lines (neutrophil count  $\leq 1.5 \times 10^9/L$ , platelet count  $\leq 30 \times 10^9/L$ , Hb  $\leq 8.5$  g/dL) for at least 2 consecutive weeks beyond day +14 post transplantation (primary PGF) or at any time point after achieving of engraftment (secondary PGF), with transfusion requirement, in the presence of full donor chimerism and in the absence of severe GVHD, cytomegalovirus (CMV) reactivation, relapse, or drug-related myelosuppression. These cut-offs were suggested as being clinically critical regarding the development of infectious complications, bleeding, or anemic syndrome.

Hematological improvement (HI) was defined as neutrophils  $>1.5 \times 10^9/L$ , platelets  $>30 \times 10^9/L$ , and hemoglobin  $>8.5$  g/dL. These cut-offs were chosen as the minimal sufficient values that do not require blood or platelet substitution and are associated with reduced risk of infectious complications. Hematological response (HR) was defined as neutrophils  $>2.5 \times 10^9/L$ , platelets  $>100 \times 10^9/L$ , and hemoglobin  $>10$  g/dL. Patients were also scored for transfusion independence and analyzed for hematological response on days +14, +20, +30, +60, and thereafter after the infusion of CD34<sup>+</sup> selected allografts.

aGVHD after SCB was defined according to criteria suggested by Glucksberg et al. [17], and cGVHD was defined as limited and extensive [18].

### Initial Allogeneic HSCT and Risk Factors

The main transplantation characteristics are represented in Table 1. The majority of patients received allografts from unrelated donors (matched, n = 15; mismatched, n = 6). In detail, 4 of 6 patients had mismatches in 1 of 10 (A, n = 1; DQB1, n = 3), whereas the remaining 2 patients had mismatches in 2 of 10 HLA loci (Cw/DQB1, and DRB1/DQB1).

### Diagnosis of CMV Reactivation

Samples for detection of CMV were taken weekly during the first 6 months after allogeneic HSCT. CMV load was measured weekly by quantitative real-time PCR on genomic DNA from the cellular fraction of whole blood. The delta-CT method was used to quantify viral genome load in comparison to human *HCK* gene expression. A CT value of 12 was the

**Table 1**  
Patients' Characteristics

Characteristics	No. of Patients
N	32
Age, median (range), yr	54 (20–69)
Sex:	
Male	22 (69%)
Female	10 (31%)
Disease:	
Primary myelofibrosis	14 (44%)
Chronic myeloid leukemia	4 (13%)
Severe aplastic anemia	4 (13%)
Non-Hodgkin's lymphoma	3 (9%)
Acute myeloblastic leukemia	2 (6%)
Acute lymphoblastic leukemia	2 (6%)
Multiple myeloma	2 (6%)
Myelodysplastic syndrome	1 (3%)
Karnofsky status at allo-HSCT:	
100%	10 (31%)
90%	17 (53%)
70%	5 (16%)
Donor type:	
MRD	11 (34%)
MUD	15 (47%)
MMUD	6 (19%)
CMV status (P/D):	
Pos/pos	19 (59%)
Pos/neg	4 (13%)
Neg/neg	5 (16%)
Neg/pos	4 (13%)
ABO status (P/D):	
Major incompatibility	13 of 31 (42%)
Minor incompatibility	11 of 31 (35%)
Combined incompatibility	1 of 31 (3%)
Identical	6 of 31 (20%)
Sex constellation (P/D):	
Identical	19 (59%)
Female/male	7 (22%)
Male/female	6 (19%)
Conditioning regimen:	
MAC	9 (28%)
RIC	23 (72%)
TBI in conditioning regimen:	
Yes	8 (25%)
No	24 (75%)
In vivo T cell depletion:	
Yes	27 (84%)
No	5 (16%)
Acute GVHD:	
Grade II	6 (19%)
Grade III	4 (13%)
Chronic GVHD:	
Limited	1 (3%)
Extensive	1 (3%)
CMV reactivation	
Yes	16 (50%)
No	16 (50%)
Poor graft function:	
Primary	13 (41%)
Secondary	19 (59%)
Interval between allo-HSCT and boost:	
$\leq 6$ months	20 (63%)
$> 6$ months	12 (37%)

Data presented are n (%) unless otherwise indicated.

allo-HSCT indicates allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; MRD, matched related donor; MUD, matched unrelated donor; MMUD, mismatched unrelated donor; P, patient; D, donor; MAC, myeloablative conditioning; RIC, reduced-intensity conditioning; TBI, total body irradiation; GVHD, graft-versus-host disease; CMV, cytomegalovirus.

threshold at or below which the CMV PCR was regarded positive. Values above 12 were regarded as borderline.

### CD34<sup>+</sup> Selected SCB

Positive CD34<sup>+</sup> selections were applied according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Cells were

labeled with anti-CD34<sup>+</sup> monoclonal antibodies (mAbs) directly coupled to magnetic microbeads (Miltenyi Biotec) and washed with subsequent purification of CD34<sup>+</sup> positive cells using CliniMACS technology. After selection, cells present in the positive and negative fractions were counted and stained with CD34<sup>+</sup> phycoerythrin (Becton Dickinson) mAbs, recognizing another epitope other than the epitope recognized by the antibodies coupled to the microbeads. For exclusion of dead cells, 7-amino actinomycin D (PharMingen, San Diego, CA) was included in all fractions. After staining, cells were measured on a flow cytometer. Recovery of normal stem cells was defined as the absolute number of CD34<sup>+</sup> positive viable cells present in the positive fraction as a percentage of the absolute number of CD34<sup>+</sup> positive viable cells present in the peripheral blood stem cells transplants before selection.

The median interval from HSCT to CD34<sup>+</sup> SCB was 5 months (range, 2 to 228). The majority of patients with primary PGF (11 of 13, 85%) received a CD34<sup>+</sup> SCB during the first 6 months, whereas the majority of patients with a secondary PGF (10 of 19, 53%) received the boost after 6 months from the development of PGF. The median amount of CD34<sup>+</sup> cells was  $3.4 \times 10^6$ /kg b.w. (range, .96 to 8.30). The median amount of CD3<sup>+</sup> T cells was  $9 \times 10^3$ /kg b.w. (range, 2 to 70).

### Statistical Evaluation

Categorical variables were compared by using of chi-square test. Continuous and ordinary variables were compared using the Mann-Whitney U test. Probabilities of OS and progression-free survival, and univariate analysis of these time-dependent noncompeting variables were calculated with Kaplan-Meier method and log-rank test. Probabilities of NRM, relapse, aGVHD, and cGVHD were estimated by using the cumulative incidences method. Variables with a potential impact on survival were entered to proportional hazards Cox regression analysis. The analysis of the time-dependent competing variables (NRM/relapse incidence; acute/chronic GVHD) was performed with a subdistributive hazards ratio model. SPSS version 17.0 (Munich, Germany) was used and the cumulative incidence analysis was performed with the R statistics software package [19].

## RESULTS

### Primary and Secondary PGF

There were 13 (41%) primary and 19 (59%) secondary PGF patients. A total of 18 patients (56%) experienced the PGF in 2 hematopoietic lines and 14 patients (44%) in 3 hematopoietic lines. The number of patients with trilineage cytopenia was similar in patients with primary and secondary PGF (7 of 13 [54%] versus 7 of 19 [37%], respectively,  $P = .47$ ). We were not able to find any significant associations between the type of PGF and the following factors: patient's and donor age, disease type, donor/patient sex constellation, donor/patient CMV serostatus constellation, donor/patient ABO blood group constellation, donor type (related/unrelated; HLA match/HLA mismatch), intensity of conditioning, in vivo T cell depletion, and total body irradiation (TBI) in conditioning.

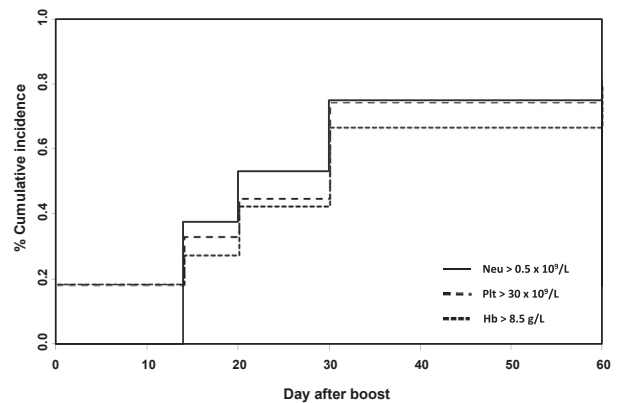
### HI and HR

HI was evaluable in all 32 patients (Figure 1). Twenty-six patients (81%) achieved HI after a median of 30 days (range, 14 to 120). There was no significant difference in the responses between patients with primary and secondary PGF. A total of 7 of 32 patients (22%) fulfilled criteria for complete hematological remission (CHR) at day +30 after the SCB. All responding patients maintained their responses during the follow-up period.

Six patients (9%) showed no response. One patient underwent a second allogeneic HSCT and another 5 patients died because of severe infectious complications.

### Factors Influencing the Hematological Improvement and Response

The disease type, patient's and donor age, the character of cytopenia (bi- or trilineage), sex constellation, CMV serostatus, ABO-status, TBI in conditioning, interval from the initial allograft to boost, and the median numbers of CD34<sup>+</sup>



**Figure 1.** Cumulative incidence of neutrophil, platelet and hemoglobin recovery after SCB.

and CD3<sup>+</sup> cells had no impact on the rate and on the time to achievement of HI or HR.

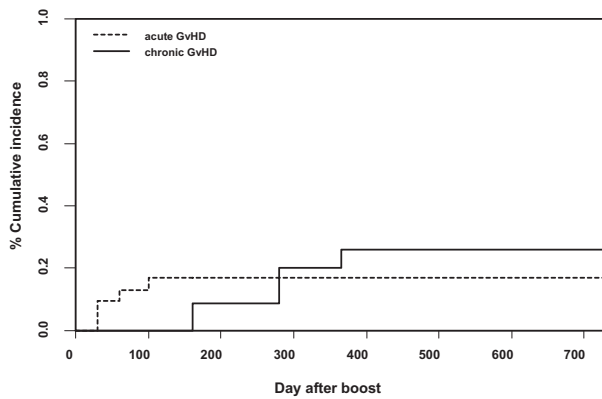
The overall response rate in patients who received CD34<sup>+</sup> SCB from related donor was higher than in recipients of unrelated boosts (11 of 11 [100%] versus 15 of 21 [71%],  $P = .07$ ). The median time to response for recipients of related boosts was shorter than that for recipients of unrelated boosts (day +20 versus day +30,  $P = .04$ ). Of the patients who received grafts from younger donors ( $\leq 35$  years,  $n = 10$ ), all developed HI. Of the patients who received grafts from older donors ( $> 35$  years,  $n = 22$ ), 6 did not show HI. These 6 patients received grafts from unrelated donor ( $P = .26$ ).

Patients who experienced HR ( $n = 7$ ) were significantly younger (median age of 39 versus 54 years [ $P = .041$ ] and received CD34<sup>+</sup> SCB from younger donors (median age of 35 versus 43 years [ $P = .036$ ]). Of the patients who received grafts from related donors ( $n = 11$ ) 3 of 5 (60%) recipients of allografts from the younger donors ( $\leq 35$  years) developed HR. No patients who received SCB from older related donors ( $> 35$  years,  $n = 6$ ) did show HR ( $P = .06$ ). Of the patients who received boosts from unrelated donors ( $n = 21$ ), 2 recipients with younger donor (40%) and 3 of those with older donor (19%) developed HR ( $P = .55$ ).

Further, we observed no correlation between the donor's age and amount of CD34<sup>+</sup> cells in the boost ( $r = .075$ ). Also, we did not observe significant difference between the median amount of CD34<sup>+</sup> cells in younger ( $\leq 35$  years,  $3.5 \times 10^6$ /kg b.w.) and older ( $> 35$  years,  $6.0 \times 10^6$ /kg b.w.;  $P = .16$ ).

### GVHD

A total of 6 patients developed aGVHD (grade II,  $n = 2$ ; grade III,  $n = 2$ ; grade IV,  $n = 2$ ) after the CD34<sup>+</sup> SCB administration. The cumulative incidence of aGVHD at 100 days after the boost administration was 17% (95% confidence interval [CI], 3% to 31%) (Figure 2). The median time to the GVHD manifestation was day +20 (range, 7 to 84). A total of 22 patients were alive after day +100 after the boost. Chronic GVHD developed in 6 patients (limited,  $n = 4$ ; extensive,  $n = 2$ ) at a median of 201 days (range, 104 to 411) after the boost administration. One patient developed extensive cGVHD after the second allogeneic HSCT; 2 patients with aGVHD and 3 patients with cGVHD after the boost had already experienced an aGVHD after the initial transplantation. The cumulative incidence of cGVHD at 1 year after the boost was 26% (95% CI, 16% to 46%) (Figure 2). We observed no significant correlations between the donor status (related versus



**Figure 2.** Cumulative incidence of acute and chronic GVHD after SCB.

unrelated; matched versus mismatched) and development of GVHD.

### Factors Associated with GVHD

The disease type, patient's and donor age, donor type (match versus mismatch; related versus unrelated), sex constellation, CMV serostatus, ABO-status, TBI in conditioning, median number of CD34<sup>+</sup> cells, and the median interval between the boost and the initial allogeneic HSCT had no significant effect on the development of GVHD. The CD3<sup>+</sup> cell dose in the graft was significantly associated with the development of aGVHD: patients who developed aGVHD received a median of  $32 \times 10^3$  CD3<sup>+</sup>/kg b.w., whereas patients without aGVHD received a median of  $8 \times 10^3$  CD3<sup>+</sup>/kg b.w. ( $P = .02$ ). We did not find any significant influence of the CD3<sup>+</sup> cell dose on the cumulative incidence of cGVHD.

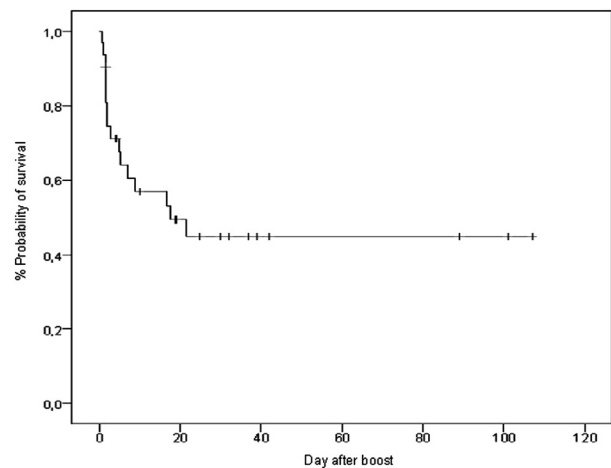
### Survival

At a median follow-up of 30 months (range, 4 to 107) 16 patients (6 nonresponding patients, 6 patients with HI, and 4 patients with CHR) had died. Of those patients, the majority (11 of 16, 69%) received SCB from matched unrelated donors, and experienced positive CMV status (11 of 16, 69%) and either major (6 of 16, 38%) or minor (6 of 16, 38%) ABO-incompatibility. The causes of death included sepsis and/or severe infection ( $n = 8$ ), severe aGVHD ( $n = 3$ ), extensive cGVHD with concomitant infection ( $n = 1$ ), relapse/disease progression ( $n = 3$ ), and cerebral hemorrhage ( $n = 1$ ). Of 6 patients who developed aGVHD, 3 expired: all those patients received SCB from matched unrelated donors with a median of  $27 \times 10^3$  CD3<sup>+</sup>/kg b.w. and already had aGVHD (grade I to III) after the allogeneic HSCT. The fourth patient developed a severe viral infection, which was associated with treatment of extensive cGVHD. One patient who experienced HI remained thrombocytopenic ( $<20 \times 10^9/L$ ) and died because of a cerebral hemorrhage.

Of the 16 living patients, 12 patients achieved HI, 3 experienced HR, and 1 achieved HR after a second allogeneic HSCT. The 2-year probability of OS was 45% (95% CI, 27% to 63%) (Figure 3). We did not observe any significant factors associated with development of response (donor type and donor age) on the survival outcome for all patients.

### DISCUSSION

PGF is a rare complication of allogeneic HSCT that is associated with increased mortality because of development



**Figure 3.** Probability of survival after SCB.

of severe infectious and hemorrhagic complications. We here report on a retrospective evaluation of 32 PGF patients who received a CD34<sup>+</sup> SCB without additional conditioning with a follow-up period of almost 10 years. All patients receiving SCB were considered. The most important risk factors for developing a PGF in our series were diagnosis of primary myelofibrosis (44% of cases) and major ABO-incompatibility (42% of cases). Other factors included prior alloimmunization, unrelated grafts, reduced intensity of conditioning, or T cell depletion. The aim of the study was to evaluate the efficacy of the CD34<sup>+</sup>-selected boost with regards to response kinetics, response rate, and stability as well as the safety and survival outcomes after the CD34<sup>+</sup> SCB administration. The limitations of this analysis were the heterogeneity of the patients and retrospective nature of the study.

First, we observed an overall HI rate of 81% (HR:  $n = 7$ , 22%). All patients maintained the response up to the last follow up. The patients who achieved HI required no regular transfusions of blood or platelets. The median time to response was 25 days (range, 14 to 120). Although the range of the interval to response was widespread, the majority of the patients developed HI during the first months after boost. We showed that the recipients of related boosts responded faster as those patients who received boosts from unrelated donors. Additionally, we noticed a trend to an increased overall rate of HI for related donors. Patients who experienced HR were younger and received boosts from younger donors. Although we did not see any significant correlation between the stem cell richness of boost and donor age, it should be taken into account that the population of patients was probably too small and, therefore, the statistical power was limited. Another possible aspect in this setting could be associated with the quality of stem cells from younger donors. Nevertheless, we were not able to find a prognostic impact of these factors (donor type and donor age) either on the development of response or on survival.

As the majority of published data regarding the use of CD34<sup>+</sup> selected SCB are case reports, it appears to be difficult to compare our results with those from other authors. For instance, Larocca et al., who studied patients with different hematologic diseases after CD34<sup>+</sup>-selected SCB infusion ( $n = 20$ ), reported that majority of those (80%) did not fulfill the criteria for CHR on the day +30 and remained cytopenic. This corresponds to a response rate of 25% at day +30 in our

study. Conversely to our study, the authors were not able to reveal any effect of the donor type, patient's age, and donor age on the response [8].

Second, the incidence of acute (day +100) and chronic GVHD (1 year) was 17% and 26%, respectively. The recipients of SCB from unrelated donors with a high amount of T cells and a positive GVHD history could represent a risk group for the development of GVHD after SCB. However, the overall GVHD rate in the present study was lower as compared with results after a second allogeneic HSCT (40% to 60%) [3–5] or administration of an unmanipulated SCB (30% to 50%) [6,7].

The 2-year OS of 45% in our study was acceptable but not optimal. Although GVHD remains an important cause of death (4 of 16, 25%), the main causes of deaths were severe infectious complications due to prolonged cytopenia after the initial allogeneic HSCT (8 of 16, 50%). Notably, 4 of 8 patients who developed CHR died because of sepsis/severe infections.

Thus, taking into account the retrospective nature and heterogeneity of patients in the study, we confirmed that the use of CD34<sup>+</sup>-selected stem cell boost without chemotherapy or immunosuppressive conditioning could be associated with improved survival outcomes. Although we did not see any significant influence of diagnosis on the outcomes, the fact that almost one half of our patients had a diagnosis of a primary myelofibrosis remains important and requires further investigation. The younger patients who receive the SCB from younger related donor might represent the best population that has benefit from this approach. For patients with GVHD history, who receive SCB with increased amount of T cells, possible immunosuppression should be discussed. Finally, the earlier proceeding of PGF patients to SCB might improve the outcomes by reducing the time of neutropenia.

#### ACKNOWLEDGMENTS

*Conflict of interest statement:* There are no conflicts of interest to report.

*Authorship statement:* E.K. and J.E.C. contributed to the paper equally.

*Financial disclosure:* The authors have nothing to disclose.

#### REFERENCES

- Gaya A, Urbano-Ispizua A, Fernandez-Aviles F, et al. Anemia associated with impaired erythropoietin secretion after allogeneic stem cell transplantation: incidence, risk factors, and response to treatment. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14:880-887.
- Ringden O, Hassan Z, Karlsson H, et al. Granulocyte colony-stimulating factor induced acute and chronic graft-versus-host disease. *Transplantation.* 2010;90:1022-1029.
- Guardiola P, Kuentz M, Garban F, et al. Second early allogeneic stem cell transplantations for graft failure in acute leukaemia, chronic myeloid leukaemia and aplastic anaemia. French Society of Bone Marrow Transplantation. *Br J Haematol.* 2000;111:292-302.
- Chewning JH, Castro-Malaspina H, Jakubowski A, et al. Fludarabine-based conditioning secures engraftment of second hematopoietic stem cell allografts (HSCT) in the treatment of initial graft failure. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13:1313-1323.
- Jabbour E, Rondon G, Anderlini P, et al. Treatment of donor graft failure with nonmyeloablative conditioning of fludarabine, antithymocyte globulin and a second allogeneic hematopoietic transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007;40:431-435.
- Remberger M, Ringden O, Ljungman P, et al. Booster marrow or blood cells for graft failure after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1998;22:73-78.
- Min CK, Kim DW, Lee JW, et al. Additional stem cell therapy for graft failure after allogeneic bone marrow transplantation. *Acta Haematol.* 2000;104:185-192.
- Larocca A, Piaggio G, Podesta M, et al. Boost of CD34<sup>+</sup>-selected peripheral blood cells without further conditioning in patients with poor graft function following allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2006;91:935-940.
- Mohty M, Faucher C, Chabannon C, et al. CD34(+) immunoselected cells for poor graft function following allogeneic BMT. *Cytotherapy.* 2000;2:367-370.
- Milone G, Tornello A, Leotta S, et al. CD34<sup>+</sup> selected haematopoietic stem cell (HSC) not preceded by any immunosuppressive therapy as effective treatment for graft failure. *Bone Marrow Transplant.* 2005;35:521-522.
- Oyekunle A, Koehl U, Schieder H, et al. CD34(+) selected stem cell boost for delayed or insufficient engraftment after allogeneic stem cell transplantation. *Cytotherapy.* 2006;8:375-380.
- Glaspay JA. Erythropoietin in cancer patients. *Annu Rev Med.* 2009;60:181-192.
- Gurion R, Shacham-Abulafia A, Shpilberg O, Raanani P. The use of myeloid colony-stimulating factors in hematologic malignancies: the role of systematic reviews and meta-analyses. *Acta Haematol.* 2011;125:68-79.
- Walenda T, Bokermann G, Ventura Ferreira MS, et al. Synergistic effects of growth factors and mesenchymal stromal cells for expansion of hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol.* 2011;39:617-628.
- Bernardo ME, Cometa AM, Locatelli F. Mesenchymal stromal cells: a novel and effective strategy for facilitating engraftment and accelerating hematopoietic recovery after transplantation? *Bone Marrow Transplant.* 2012;47:323-329.
- Liu X, Wu M, Peng Y, et al. Improvement in poor graft function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation upon administration of mesenchymal stem cells from third-party donors: a pilot prospective study. *Cell Transplant.* 2013 [Epub ahead of print].
- Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation.* 1974;18:295-304.
- Sullivan K, Shulman H, Storb R, et al. Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression. *Blood.* 1981;57:267-276.
- Scrucca L, Santucci A, Aversa F. Competing risk analysis using R: an easy guide for clinicians. *Bone Marrow Transplant.* 2007;40:381-387.



## 2. Einleitung

Die Übertragung von Stammzellen der Hämatopoese durch intravenöse Infusion wird als Stammzelltransplantation (SZT) bezeichnet. Bei einer allogenen SZT (allo-SZT) stammen die Stammzellen von einem anderen Individuum. Hingegen stammen die Stammzellen bei einer autologen SZT vom gleichen Individuum und müssen vor der Gabe einer Hochdosischemotherapie (bzw. Radiochemotherapie) apheresiert und kryokonserviert werden.

### 2.1 Allogene Stammzelltransplantation (allo-SZT)

*Therapieprinzip:* Bei der allo-SZT ist neben der Unterstützung der hämatopoetischen Rekonstitution ein immuntherapeutischer Effekt der Spenderzellen gegen die jeweilige hämatologische Neoplasie („Graft-versus-Leukämie“- bzw. „Graft-versus-Lymphom“-Effekt) erwünscht. (Warren 2010) In der Mehrheit der Fälle ist dieser erwünschte immunologische Effekt mit einer „graft versus host disease“ (GvHD; „Spender-gegen-Wirt-Erkrankung“) verbunden. (Ferrara und Antin 2010) Günstige Voraussetzungen zur Entwicklung eines „Graft-versus-Leukämie“-Effekts sind die Anwesenheit von Leukämie-spezifischen Markern (z.B. das BCR-ABL1-Fusionstranskript bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML)) oder immunologische Inkompatibilität (z.B. der Proteine des "major" oder "minor" Histokompatibilitätskomplexes). Des Weiteren kommt der „Graft-versus-Leukämie“-Effekt bei geringerer Proliferation der hämatologischen Neoplasie und bei einer geringeren Leukämiezelllast besser zum Tragen. Besteht die prinzipielle Möglichkeit der Notwendigkeit einer allo-SZT, sollte unverzüglich mit einem Transplantationszentrum (zur Prüfung der Indikation sowie ggf. zur Einleitung einer Spendersuche) Kontakt aufgenommen werden.

*Indikationen:* Die Erkrankungen, bei denen eine allo-SZT durchgeführt werden könnte, können prinzipiell in zwei Gruppen aufgeteilt werden: (i) Erkrankungen, bei denen eine allo-SZT eine in unabhängigen Studien nachgewiesene Verbesserung der Prognose im Vergleich zu anderen Therapieoptionen bewirken kann: Beispiele sind akute Leukämien mit Hochrisikoprofil (akute myeloische Leukämie, AML, und akute lymphatische Leukämie, ALL), oder die schwere aplastische Anämie (SAA); (ii) Erkrankungen, bei denen eine allo-SZT zu einer möglichen Verbesserung der Prognose im Vergleich zu den anderen Therapieoptionen führt (z.B. bei Hochrisiko-Lymphomen oder multiplem Myelom). Die Entscheidung bezüglich der Durchführung einer allo-SZT muss für jeden Patienten individuell getroffen werden. (Blume und Krance 2010) Angesichts einer verbesserten Risikostratifikation sowie verbesserter supportiver Maßnahmen bzw. der Einführung spezieller Konditionierungsprotokolle erhalten die älteren Patienten mit chronischen hämatologischen Erkrankungen (z.B. mit primärer Myelofibrose (PMF), myelodysplastische Syndrome (MDS)) in den letzten Jahren zunehmend eine allo-SZT. Zumeist kommen Patienten mit einer Hochrisikokonstellation für eine allo-SZT in Frage. Seltener Indikationen zur allo-SZT sind hereditäre Störungen der Hämatopoese, oder in Einzelfällen seltene Stoffwechselerkrankungen. (sh. Tabelle 1)

**Tabelle 1:** Indikationen zur allo-SZT (Erwachsene)

Entität	Indikation
AML	<ul style="list-style-type: none"> <li>• primäres Induktionsversagen</li> <li>• Transplantation in erster CR bei ungünstigem genetischem Risikoprofil</li> <li>• Rezidiv</li> </ul>
ALL	<ul style="list-style-type: none"> <li>• primäres Induktionsversagen</li> <li>• Transplantation in erster CR bei ungünstigem Risikoprofil</li> <li>• Rezidiv</li> <li>• Anstieg der MRD-Last (im Rahmen von Studien)</li> </ul>
CML	<ul style="list-style-type: none"> <li>• fortgeschrittene Stadien (Akzeleration, Blastenphase)</li> <li>• Resistenz oder Suboptimales Ansprechen auf TKIs der 2. (Nilotinib, Dasatinib) oder 3. (Ponatinib) Generation, insbesondere bei Nachweis klonaler Veränderungen innerhalb der Ph<sup>+</sup> Hämatopoese</li> </ul>
MDS	Hochrisikoprofil (nach IPSS bzw. IPSS-R), Zytogenetik
PMF	Patienten in fortgeschrittenen Stadien (ab Intermediate II nach D-IPSS), einzige kurative Option
Lymphome	Nur in Ausnahmesituationen, zum Beispiel Rezidiv nach autologer SZT bei tendenziell jüngeren Patienten
Chronische lymphatische Leukämie	In Ausnahmesituationen, zum Beispiel Hochrisikoprofil (TP53-Mutation) bei jüngeren Patienten
Multiples Myelom	Der Stellenwert der allogenen SZT wird noch in Studien evaluiert. Gegebenenfalls ist die Indikation bei Hochrisikopatienten oder jüngeren Patienten zu prüfen.
Aplastische Anämie	Indikation zur allogenen SZT u.a. abhängig vom Schweregrad, Ansprechen auf Immunsuppression, Verfügbarkeit eines Familienspenders
Hämoglobinopathien	z.B. $\beta$ -Thalassaemia major (die meisten Transplantationen bei Hämoglobinopathien werden allerdings im Kindesalter durchgeführt)

CR: Komplete Remission; MRD: „minimal residual disease“; Ph<sup>+</sup>: Philadelphia-positive; IPSS: International Prognostic Scoring System; IPSS-R: Revision des IPSS; TKIs: Tyrosinkinaseinhibitoren

**Spenderwahl:** Die humanen Leukozyten-Antigene (HLA) dienen der Präsentation endo- und exogener Peptid-Antigene. HLA-Moleküle der Klasse I (HLA-A, -B, und Cw) werden überall im menschlichen Organismus exprimiert. HLA-Moleküle der Klasse II (HLA-DR, DQ, DP) werden ausschließlich von den Zellen der Hämatopoese und des Immunsystems exprimiert. Die HLA-Moleküle binden an endogene Proteinbestandteile (Klasse I) oder exogene Eiweißstrukturen (Klasse II) und werden dann von den T-Zellen erkannt. Die HLA-Merkmale werden in der Regel gekoppelt mit dem jeweiligen mütterlichen oder väterlichen Chromosom weitergegeben. (Mickelson und Petersdorf, 2010) HLA-identen Geschwister gelten als am besten geeignete Stammzellspender, jedoch haben nur ca. 30% der Patienten ein HLA-identen Geschwister. Wenn Empfänger und Spender eineiige Zwillinge sind, spricht man von einer „syngenen“ SZT. Falls kein HLA-identer Geschwisterspender zur Verfügung steht, wird in den allermeisten Fällen ein HLA-kompatibler Fremdspender gefunden. Alternativ ist die allogene SZT anhand von Nabelschnurblut möglich. In manchen Fällen werden sogenannte haploidente Transplantationen durchgeführt, z.B. vom Vater oder der Mutter auf das Kind, wobei nur 50% des Genoms übereinstimmen.

Bei Verwendung der heute üblichen hochauflösenden Genotypisierung für das HLA-Muster bestehen hinsichtlich der Risiken wie einer GvHD zumeist keine relevanten Unterschiede zwischen HLA-identen verwandten und nicht-verwandten Spendern mehr. In Ausnahmefällen kann eine Abweichung des HLA-Typs in 1 von 10 getesteten Genloci akzeptiert werden ("Mismatch-Transplantation"), wenngleich das Transplantationsrisiko dann als etwas höher zu bewerten ist.

**Stammzellquelle:** Als Stammzellquelle für erwachsene Patienten dienen inzwischen am häufigsten Zytokin-mobilisierte periphere Blutstammzellen, seltener kommen Knochenmark oder sehr selten postpartales Nabelschnurblut in Frage.

**Knochenmark:** Um den Aufbau einer stabilen Hämatopoese zu erreichen, muss eine Zielmenge von  $2-3 \times 10^8$  nukleären Zellen pro Kilogramm Körpergewicht des Empfängers gewonnen werden. Das entspricht ca. 10-15 ml Knochenmark pro

Kilogramm Körpergewicht des Spenders. Die absolute Volumengrenze für die Knochenmarkentnahme beträgt 20 ml pro Körpergewicht des Spenders. Die Entnahme findet unter sterilen Bedingungen unter Vollnarkose des Spenders statt. Die Risiken für den Spender sind gering und betreffen hauptsächlich anästhesiologische Komplikationen, lokale Infektionen, Hämatome oder postoperatives Fieber. Falls eine Blutgruppeninkompatibilität im Sinne einer ABO-major-Mismatch Situation besteht, ist eine Entfernung der Erythrozyten aus dem Knochenmark mittels Sedimentation oder Zentrifugation notwendig. (Confer et al. 2010)

Periphere Blutstammzellen: Hämatopoetische Stammzellen zirkulieren auch im peripheren Blut; ihre Konzentration kann durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren (z.B. Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor; G-CSF) deutlich gesteigert werden. Nach Stimulation mit G-CSF werden Spitzenwerte an den Tagen 4 oder 5 erreicht. Zu diesem Zeitpunkt erfolgt die Apherese der peripheren Blutstammzellen. Die G-CSF-stimulierten Neutrophilen setzen im Knochenmark Proteasen frei (z.B. neutrophile Elastase, Cathepsin G), welche die Freisetzung ins periphere Blut ermöglichen. Die Anwendung von G-CSF zur Stammzellmobilisierung ist mit geringeren bis mittelschweren Knochenschmerzen, Kopfschmerzen, sowie Müdigkeit für die Spender verbunden. Schwerere Nebenwirkungen wurden selten beschrieben. In Einzelfällen traten lebensbedrohliche Komplikationen wie thrombembolische Ereignisse, Milzrupturen oder anaphylaktoide Reaktionen auf. Langzeitfolgen für die Spender durch den Einsatz von G-CSF wurden bisher nicht beschrieben. Die periphere Blutstammzellentnahme erfolgt überwiegend ambulant, eine Narkose ist nicht notwendig. Da im fertigen Aphereseprodukt fast ausschließlich nukleäre Zellen vorhanden sind, muss die ABO-Blutgruppeninkompatibilität bei einer PB-SZT nicht beachtet werden. (Confer et al. 2010)

Nabelschnurblut: Dieses ist reich an hämatopoetischen Stammzellen und kann die Rekonstitution der Hämatopoese nach allo-SZT ermöglichen. Kryokonservierte Nabelschnurblutpräparate wurden als Alternative bei nicht verfügbaren Familien- oder Fremdspendern etabliert. (Broxmeyer und Smith 2010) Aufgrund der geringeren Proliferationsaktivität der T-Zellen im Nabelschnurblut ist das Risiko einer GvHD geringer, darüber hinaus kann ein höherer Grad von HLA-Inkompatibilität toleriert werden. Allerdings ist eine Nabelschnurbluttransplantation bei erwachsenen Patienten wegen einer relativ niedrigeren Stammzellzahl mit einem verzögerten Engraftment (= das Anwachsen der Stammzellen) und einem höheren Risiko eines „graft rejection“ (=Transplantatverlust) verbunden. (sh. Tabelle 2)

**Tabelle 2:** Übersicht über die verschiedenen Stammzellquellen für die allo-SZT

Stammzellquelle	Knochenmark	Periphere Blutstammzellen	Nabelschnurblut
Stammzellgewinnung	Stationäre Behandlung und Vollnarkose der Spender	Entnahme ambulant möglich	Notwendigkeit einer Nabelschnurblutbank
Stammzellgabe	Meist frisches SZ-Präparat, selten kryokonserviert	Meist frisches SZ-Präparat, selten kryokonserviert	Kryokonserviert
Engraftment	Etwas verzögertes Engraftment (durchschnittlich Tag +20-22)	Schnelles Engraftment (durchschnittlich Tag +14-16)	Deutlich verzögertes Engraftment, höheres Risiko eines „graft failure“
GvHD-Risiko	Geringeres Risiko einer GvHD	Höheres Risiko einer GvHD angesichts erhöhter T-Zellzahl und G-CSF-Effekt	Geringeres Risiko einer GvHD
Zielgruppe	Bessere Option für erwachsene Patienten mit nicht-malignen Erkrankungen (z.B. SAA)	Bessere Option für erwachsene Patienten mit malignen Erkrankungen	Bessere Option für pädiatrische Patienten mit nicht-malignen Erkrankungen

**Durchführung der allo-SZT:** Die allo-SZT beginnt mit der Konditionierung mit einer Chemotherapie oder Radiochemotherapie. (Bensinger 2010) Die Konditionierungstherapie dient zur Eradikation der Leukämiezellen. Außerdem muss zur Vermeidung einer Transplantatabstoßung eine Immunsuppression oder weitgehende Immunablation erreicht werden. Zur Immunsuppression werden meistens Calcineurininhibitoren wie Cyclosporin A oder Tacrolimus verwendet. Darüber hinaus werden oftmals Antikörper mit Anti-T-Zell-Wirkung wie Antithymozytenglobulin (ATG) eingesetzt. 1–2 Tage nach der Konditionierungstherapie erfolgt die Stammzell- bzw. Knochenmarkgabe über einen großvolumigen zentralvenösen Katheter. (Chao und Sullivan 2010) Die Rekonstitution der Hämatopoese wird durch wenige Blutstammzellen erreicht, die morphologisch nicht zu identifizieren sind und nur durch funktionelle Tests („colony assays“) und den immunologischen Stammzellmarker CD34 definiert werden. Für eine allo-SZT werden im Minimum ca.  $2,0 \times 10^8$  kernhaltige Knochenmarkzellen oder  $2,0 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> periphere Blutstammzellen pro kg KG des Empfängers benötigt. Ist die Durchführung der allo-SZT erst nach einem etwas längeren Intervall möglich, können die Stammzellen nach Kryokonservierung mittels DMSO über längere Zeit in Flüssigstickstoff konserviert werden. Die periphere Aplasiaphase dauert nach myeloablativer Konditionierung 8 - 14 Tage bei einer PB-SZT bzw. 21 - 28 Tage bei einer KMT. Sie kann durch die Gabe von Wachstumsfaktoren um 1-3 Tage verkürzt werden. Nach dosisreduzierter bzw. Toxizitäts-geminderter Konditionierung („reduced intensity conditioning“, RIC) werden kürzere Aplasiaphasen beobachtet. (sh. Tabelle 3)

**Tabelle 3:** Beispiele für Konditionierungsschemata zur allo-SZT\*

<b>Myeloablative Konditionierung</b>			
<b>TBI/Cy</b>			
TBI	2 x 2	Gy	d -6 bis -4
Cyclophosphamid	60	mg/kg KG	d -3 bis -2
<b>Bu/Cy</b>			
Busulfan	4 x 1.0**	mg/kg KG	d -7 bis -4
Cyclophosphamid	60	mg/kg KG	d -3 bis -2
<b>Reduzierte Konditionierung</b>			
<b>FC</b>			
Fludarabin	25	mg/m <sup>2</sup>	d -7 bis -3
Cyclophosphamid	1000	mg/m <sup>2</sup>	d -4 bis -3

\*Die hier aufgeführten Schemata sind nur als Beispiele gedacht und eignen sich in dieser Form nicht als Grundlage für Transplantationspläne; \*\* 4 x 1.0 mg/kg p.o., oder 4 x 0.8 mg/kg i.v.; TBI: „total body irradiation“, Ganzkörperbestrahlung

**Komplikationen:** Die Komplikationen hängen u.a. von der Art der Konditionierung, dem Krankheitsstatus, der Vorbehandlung und der Dauer der Aplasie ab. Die Rate

der transplantationsbedingten Mortalität (TRM) ist abhängig von Alter und Grunderkrankung des Empfängers, Konditionierungsverfahren und HLA-Übereinstimmung von Patienten und Spender sehr variabel. Sie beträgt 10–40 %.

Infektionen: Für die Phase unmittelbar nach Konditionierung und allo-SZT wird die Unterbringung in einem Zimmer mit steril filtrierter Raumluft empfohlen. Im Rahmen der allo-SZT kommt es zu einer mehrtägigen Aplasie. Aufgrund der Notwendigkeit einer Immunsuppression wird die T-Lymphozytäre Abwehr über einen Zeitraum von 3-12 Monaten supprimiert. Eine Prophylaxe von bakteriellen Infekten (Leather und Wingard 2010), Herpesvirus-Reaktivierungen (Zaia 2010, Ito 2010, Ho und Arvin 2010, Hsieh und Ambinder 2010), Mykosen (Brown 2010) und *P. jirovecii* in dieser Zeit ist obligat. Daher wird ein Monitoring der CMV-Viruslast und bei Nachweis einer CMV-Reaktivierung eine präemptive Behandlung mit Ganciclovir oder Valganciclovir durchgeführt. In der Frühphase nach allo-SZT treten vor allem bakterielle Infektionen auf (z.B. Sepsis durch Haut- oder Darmflora, Urosepsis), wohingegen spätere Infektionen am ehesten viraler Genese sind (z.B. CMV-, EBV-Reaktivierung, HSV-Stomatitis, BK-Virus-assoziierte hämorrhagische Zystitis). Pilzinfektionen können in jeder Phase nach allo-SZT auftreten (z.B. Candida-Sepsis oder Lungenaspergillöse).

Graft versus host disease (GvHD): Wesentliches Gefahrenmoment nach allo-SZT ist die immunologische Reaktion des Spenderimmunsystems gegen den Empfänger. Zur Prophylaxe der GvHD nach allo-SZT werden Cyclosporin A, Tacrolimus, Steroide, Methotrexat, Mycophenolatmofetil (MMF) und ATG eingesetzt. Eine Entfernung der T-Lymphozyten aus dem Transplantat durch *ex-vivo*-Manipulationen ist sehr effektiv, allerdings mit einer Zunahme anderer Komplikationen (Transplantatabstoßung bzw. „graft rejection“ oder Rezidive) verbunden. Die akute GvHD (in der Regel Auftreten in den ersten 100 Tagen) manifestiert sich an der Haut mit Erythemen, mit Diarrhoen bei intestinaler Manifestation, bzw. mit einer Hepatopathie. Als Intervention werden Steroide eingesetzt, bei Nichtansprechen muss die immunsuppressive Therapie dann erweitert werden, beispielsweise durch MMF. (Cutler und Antin 2010) Für die steroidrefraktärer GvHD gibt es momentan keine etablierte Therapie; verschiedene Therapieoptionen unter anderen, extrakorporale Photopherese, Ruxolitinib oder Ibrutinib werden aktuell im Rahmen der Studien evaluiert. (Yalniz et al. 2018, Jagasia et al. 2018) Eine histologische Sicherung der GvHD ist vor Therapiebeginn anzustreben. Die chronische GvHD zeigt häufig ein sklerodermieartiges Bild mit Kollagenfaservermehrung der Haut; die Behandlung erfolgt mit Steroiden, Cyclosporin A und MMF. (Pavletic und Vogelsang 2010) Schwere Hautmanifestationen sind mitunter eine Indikation für eine PUVA-Bestrahlung oder ggf. extrakorporale Photopherese.

Spätkomplikationen: Als Folge der Hochdosis-Radiochemotherapie können Spätkomplikationen wie eine Lungenfibrose, Kataraktbildung oder Zweitneoplasien auftreten. Daher hat die Langzeitnachsorge für Patienten nach allogener SZT eine große Bedeutung.

## **2.2 Schlechte Transplantatfunktion („poor graft function“)**

Die schlechte Transplantatfunktion (STF) zählt zu nicht häufigsten, allerdings zu den klinisch relevantesten Komplikationen nach allo-SZT. Bei persistierender Leuko-, Thrombozytopenie und/oder Anämie erhöht sich die TRM durch hohe Infektionsrate, hohes Blutungsrisiko und transfusionsbedingte Eisenüberladung. (Rondón et al. 2008)

Die Fähigkeit der hämatopoetischen Stammzellen ins Knochenmark zu wandern und ein neues hämatopoetisches und Immunsystem zu produzieren im Körper eines anderen Individuums stellt eine wesentliche Voraussetzung für den Erfolg der allo-SZT dar. (Masouridi-Levrat et al. 2016) Dieser s.g. „homing effect“ erfordert: (i) die Expression von Selektinen, Integrinen und anderen Adhäsionsmolekülen und ihren Liganden auf den endothelialen und hämatopoetischen Stammzellen; (ii) Produktion von Matrix-gebundenem stromal-cell derived factor-1 (SDF-1) und Expression von CXCR4-Rezeptor auf hämatopoetischen Stammzellen; (iii) Herstellung von Chemokinen (z.B. Annexin II, VCAM-1, CD44, CD164, Osteopontin) durch Zellen der Mikroumgebung (z.B. Osteoblasten, Endothelzellen). (Lapidot et al. 2005, Lévesque et al. 2010) Im Hinblick auf die Komplexität dieser Prozesse ist es unerwartet, dass allo-SZT im Allgemeinen eine relativ geringe Rate schlechter Transplantatfunktion hat.

Eine (Pan)Zytopenie nach allo-SZT kann viele unterschiedliche Gründe haben, sowie: (i) Rezidiv der Grunderkrankung; (ii) virale Reaktivierung (z.B. CMV oder HHV6) (Boeckh et al. 2003, Lagadinou et al. 2010); (iii) GvHD (Wolff 2002); (iv) medikamenten-toxische Veränderungen (Busca et al. 2007). Über eine STF spricht man, wenn alle sekundären Gründe einer (Pan)Zytopenie ausgeschlossen sind. Die Inzidenz von STF variiert in veröffentlichten Berichten zwischen 1% und 27%. (Larocca et al. 2006, Olsson et al. 2013, Stasia et al. 2014)

Einige Faktoren können das Risiko der STF erhöhen, unter anderen z.B. höheres Empfänger- und Spenderalter wurden in Tiermodellen mit Defekten in der Fähigkeit der Stammzellen die Knochenmark niche (Pearce et al. 2007) zu erreichen assoziiert. Dieses zusammen mit einem beschleunigten Telomerenverlust kann bei der Entwicklung der STF beitragen. (Wynn et al. 1998)

Die Patienten mit chronischen myeloproliferativen Neoplasmen (z.B. PMF, CML), die in der Regel keine intensive Chemotherapie erhalten, haben eine höhere Rate schlechter Transplantatfunktion im Vergleich zur Patienten mit akuten Leukämien möglicherweise aufgrund der Persistenz der residualen Effektorzellen (Kerbaux et al. 2005, Kröger et al. 2009, Alchalby et al. 2016) und defekter unterstützender Mikroumgebung. (Kerbaux et al. 2007) Eine intensive Transfusionsanamnese, die zur Allo-Immunsierung führt, wurde bei Patienten mit SAA mit schweren Abstoßungsreaktionen assoziiert. (Champlin et al. 1989) Zu den anderen Faktoren, die mit einem erhöhten STF-Risiko verbunden sind, zählen HLA-nicht idente Spender (Davies et al. 2000, Flomenberg et al. 2004); Blutgruppeninkompatibilität zwischen Spender und Empfänger (Stussi et al. 2002; Remberger et al. 2007); T-Zell-Depletion, niedrigere Anzahl der CD34<sup>+</sup> Zellen im Transplantat (Weaver et al. 1997); Immunsuppression nach Transplantation (Storb et al. 1997); Durchführung einer Konditionierung mit reduzierter Intensität oder vorherige Bestrahlung vor allo-SZT. (Olesen et al. 2000, Mazo et al. 2002)

Es gibt verschiedene therapeutische Ansätze, die für die Behandlung von STF verwendet werden können:

(i) *Wachstumsfaktoren*, z.B. wie G-CSF oder Erythropoietin (Gaya et al. 2008, Ringden et al. 2010). Obwohl die Verwendung von myeloischen Wachstumsfaktoren die Neutrophilenproduktion verbessern kann, bestünde in dem Fall eine Verzögerung des Thrombozytenengraftments sowie erhöhtes GvHD-Risiko. (Ringden et al. 2010) Die Verwendung von Thrombopoietin-Rezeptor-Agonisten im Rahmen der allo-SZT bleibt noch unklar wegen geringer Patientenzahl in veröffentlichten Studien. (Calmettes et al. 2011, Limei et al. 2013, Dyba et al. 2016) Die Verwendung von Wachstumsfaktoren kann zwar die Blutwerte verbessern, allerdings bleibt ihre

Wirkung auf die Hämatopoese vorübergehend, da dieser therapeutische Ansatz die Ursache von STF nicht aufheben kann.

(ii) *zweite allo-SZT*. Die Regeneration mit einer zweiten allo-SZT nach RIC mit dem gleichen oder einem alternativen Spender kann bei ca. 66% - 100% Patienten zum Ansprechen führen. Doch aufgrund der erhöhten Raten von GvHD (40-60%) und TRM (50-60%) blieb das Gesamtüberleben in früheren Studien inakzeptabel niedrig (20-35%). (Guardiola et al. 2000, Chewning et al. 2007, Jabbour et al. 2007, Jeffrey et al. 2010) Die Haupttodesursache hier waren schwere Infektionen. (Guardiola et al. 2000)

(iii) *die Verwendung von einem nicht-modifizierten* (Remberger et al. 1998, Min et al. 2000) *oder CD34<sup>+</sup>-selektierten Stammzellboostes (SZB)*. (Larocca et al. 2006, Mohty et al. 2000, Milone et al. 2005, Oyekunle et al. 2006) Der erste Versuch, das Überleben durch die Reduktion der Toxizität zu verbessern wurde von Remberger *et al.* vorgenommen. (Remberger et al. 1998) Die Autoren haben den 16 von 20 Patienten mit STF ein nicht-modifiziertes SZB ohne Konditionierung verabreicht. Durch diesen Ansatz wurde bei der Mehrheit der Patienten eine Verbesserung der Hämatopoese erreicht, was zu einer verbesserten 3-jährigen Überlebensrate von 43% führte. Es wurden jedoch hohe Raten an akuter und chronischer GvHD von 31% und 50% berichtet. Min *et al.* (Min et al. 2000) haben 11 von 20 Patienten mit STF ein nicht-modifiziertes SZB verabreicht. Hier wurde über eine bessere 3-jährige Überlebensrate von 71% und eine GvHD-Rate von 30% berichtet. Zur weiteren Reduktion der Inzidenz der potenziell tödlichen GvHD, die mit Anwesenheit von T-Zellen im Stammzellpräparat abhängig sein kann, wurde die Anwendung eines CD34<sup>+</sup>-selektierten SZB vorgeschlagen.

### **3. Zusammenfassung der Arbeit**

#### **3.1 Ziel der Arbeit**

Wie oben bereits erwähnt wurde, stellt STF allgemein eine seltene, allerdings eine klinisch sehr relevante Komplikation der allo-SZT dar. Die Anwendung eines CD34<sup>+</sup>-selektierten SZB wurde in früheren Studien für die Therapie dieser Komplikation als realistisch gezeigt. (Oyekunle et al. 2006) Allerdings ist die Datenlage zu dem Verfahren sehr begrenzt. Um Sicherheit und Wirksamkeit dieses Behandlungskonzepts weiter zu erforschen, führten wir die aktuelle Studie durch.

#### **3.2 Patienten**

Die retrospektive Zwei-Zentren-Analyse basiert sich auf Auswertung einer Gruppe von 32 Patienten, die ein CD34<sup>+</sup>-selektierter SZB ohne vorherige Konditionierung in den Jahren von 2002 bis 2011 erhielten. Es wurden 10 männliche (31%) und 22 weibliche (69%) Patienten mit einem Durchschnittsalter von 54 Jahre (20 - 64) und verschiedenen hämatologischen Erkrankungen analysiert.

#### **3.3 Definitionen**

##### **3.3.1 Das Engraftment:**

- der Neutrophilen: der erste von drei aufeinanderfolgenden Tagen, wo die absolute Neutrophilenzahl  $\geq 0.5 \times 10^9/L$  ohne G-CSF Stimulation betrug.

- der Thrombozyten: der erste von drei aufeinanderfolgenden Tagen, wo die Thrombozytenzahl unabhängig von der Thrombozyten-Substitution  $\geq 20 \times 10^9/L$  war.

### 3.3.2 Schlechte Transplantatfunktion

Das STF wurde durch eine persistierende Zytopenie in mindestens zwei hämatopoetischen Linien (Neutrophilenzahl  $\leq 1.5 \times 10^9/L$ , Thrombozytenzahl  $\leq 30 \times 10^9/L$ , Hb  $\leq 8.5$  g/dl) für mindestens zwei aufeinanderfolgende Wochen nach dem Tag +14 nach allo-SZT bei vollständigem Spenderchimärismus und in Abwesenheit von schwerer GvHD, CMV-Reaktivierung, Rezidiv oder medikamentenbedingter Myelosuppression definiert.

*Primäre STF* wurde als eine Drei- oder Zwei-Linien-Zytopenie ohne erfüllten o.g. Engraftmentkriterien diagnostiziert. *Sekundäre STF* wurde als eine Drei- oder Zwei-Linien-Zytopenie bei erfüllten o.g. Engraftmentkriterien diagnostiziert. (Larocca et al. 2006)

Die *hämatologische Verbesserung (hV)* wurde als: Neutrophile  $>1.5 \times 10^9/L$ , Thrombozyten  $>30 \times 10^9/L$  und Hämoglobin  $>8.5g/dL$  definiert.

Das *hämatologische Ansprechen (hA)* wurde als: Neutrophile  $>2.5 \times 10^9/L$ , Thrombozyten  $>100 \times 10^9/L$  und Hämoglobin  $>10g/dl$  definiert.

Die *cut-offs* für das Ansprechen wurden auf Grund der klinischen Relevanz (Infektionsrisiko, Blutungsrisiko, Transfusionsbedarf) festgelegt.

Die akute Spender-gegen-Wirt Reaktion (GvHD) wurde nach Kriterien von Glucksberg *et al.* (Glucksberg et al. 1974) Die chronische GvHD wurde nach Kriterien des National Institute of Health (NIH) definiert. (Filipovich et al. 2005)

### 3.4 CD34<sup>+</sup>-selektierte SZBs

Positive CD34<sup>+</sup> Selektion wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) durchgeführt. Die Zellen wurden mit monoklonalen Anti-CD34<sup>+</sup>-Antikörpern (mAbs), die direkt an magnetische Mikroperlen (Miltenyi Biotec) gekoppelt waren, markiert, mit anschließender Reinigung von CD34<sup>+</sup>-positiven Zellen unter Verwendung der CliniMACS-Technologie gewaschen.

Das mediane Intervall zwischen allo-SZT bis zu CD34<sup>+</sup>-selektiertem SZB betrug 5 Monate (2 - 228). Die mittlere Menge an CD34<sup>+</sup>-Zellen betrug  $3.4 \times 10^6$  /kg Körpergewicht (0.96 – 8.30). Die mittlere Menge an CD3<sup>+</sup>-T-Zellen betrug  $9 \times 10^3$  / kg Körpergewicht (2 - 70).

### 3.5 Folgende Faktoren wurden in Bezug auf Ansprechrate und Inzidenz der GvHD untersucht:

- Alter des Patienten und Spender
- Geschlecht der Patienten und Spender
- der Charakter der Zytopenie (Bi- oder Trilineare)
- Transfusionsbedarf vor allo-SZT (38% der Patienten)
- Stammzellspender (verwandte, 34%; nicht-verwandte: HLA-idente, 47%; HLA-nicht-idente, 19% der Patienten).



- Cytomegalovirus (CMV) -Serostatus zwischen Empfänger und Spender (positiv/positiv, 59% der Patienten).
- Inkompatibilität bezüglich des ABO-Systems (81% der Patienten).
- Intensität der Konditionierung (RIC in 72% der Patienten).
- Die Ganzkörperbestrahlung (TBI, Median 4 Gy; 2 - 12 Gy; in 25% der Patienten)
- Die mittlere CD34<sup>+</sup>-Zellzahl ( $6,0 \times 10^6$  Zellen/kg Körpergewicht; 1.7 - 11.0).
- Intervall zwischen allo-SZT und SZB (Median, 6 Monate)

### 3.6 Resultate

#### 3.6.1 Ansprechen

- *hV*: n=26 (81%) der Patienten innerhalb eines Median von 20 Tagen nach der SZB (14 - 847).
- *hA*: n=7 (22%) der Patienten am Tag +30 nach SZB

Alle Patienten mit *hV* (eingeschlossen die Patienten mit *hA*) behielten ihr Ansprechen während der gesamten Nachbeobachtungszeit bei.

Sechs Patienten (9%) zeigten keine hämatologische Besserung. Ein Patient wurde einer zweiten

allo-SZT unterzogen während weitere fünf Patienten an schweren infektiösen Komplikationen starben.

#### 3.6.2 Faktoren, das Ansprechen beeinflussen

Folgende Faktoren haben **keine** Auswirkung gezeigt: der Charakter der Zytopenie (Bi- oder Trilineare), Geschlechtskonstellation, CMV-Serostatus, ABO-Status, TBI in der Konditionierung, Intervall von der anfänglichen allo-SZT zu SZB und die mittlere Anzahl von CD34<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> Zellen.

Folgende Faktoren haben **eine Auswirkung** gezeigt:

- die mediane Zeit bis zum Ansprechen für Empfänger der verwandten SZB war kürzer als die für Empfänger der nicht-verwandten SZB (Tag +20 vs. Tag +30,  $p = 0.039$ ).
- Patienten, bei denen *hV* auftrat, waren signifikant jünger als die nicht ansprechenden Patienten: 39 Jahren *versus* 54 Jahren ( $p=0.041$ ).
- Die Patienten, die *hV* zeigten, erhielten SZB von jüngeren Spendern: 35 vs 43 Jahren ( $p=0.036$ ).

#### 3.6.3 Spender-gegen-Wirt Reaktion (GvHD)

Insgesamt sechs von 32 (19%) auswertbaren Patienten entwickelten nach der SZB-Gabe eine akute GvHD (Grad II, n = 2; Grad III, n = 2; Grad IV, n = 2). Die mittlere Zeit bis zur GvHD-Manifestation betrug 20 Tage nach SZB (7 - 84). Zwei Patienten hatten bereits nach einer akuten GvHD der initialen allo-SZT. Drei von sechs Patienten mit aGvHD waren verstorben. Die kumulative Inzidenz von aGvHD am Tag +100 nach der SZB betrug 17% (95% Konfidenzintervall [CI] 3% - 31%).

#### 3.6.4 Faktoren, die Inzidenz der GvHD beeinflussten

Die Faktoren, die *keine* signifikanten Einfluss hatten: das Patienten- und Spenderalter, der Spendertyp, die Geschlechtskonstellation, der CMV-Serostatus, der ABO-Status, TBI in der Konditionierung, die mediane CD34<sup>+</sup>-Zellzahl und das mediane Intervall zwischen der SZB und der initialen allo-SZT.

Folgende Faktoren haben eine Auswirkung gezeigt:

- Die CD3<sup>+</sup>-Zelldosis war signifikant mit der Entwicklung aGvHD assoziiert: Median von  $32 \times 10^3$  CD3<sup>+</sup>/kg Körpergewicht bei GvHD<sup>+</sup> versus Median von  $8 \times 10^3$  CD3<sup>+</sup>/kg Körpergewicht ( $p=0.02$ ).

### 3.6.5 Überleben

Bei einer medianen Nachbeobachtungszeit von 30 Monaten (4 - 107) war eine Anzahl von 16 Patienten (von diesen fünf, die nicht angesprochen hatten) gestorben. Die Todesursachen waren: Sepsis / schwere Infektion,  $n = 9$ ; schwere aGvHD,  $n = 3$ ; Rezidiv / Progress der Grunderkrankung,  $n = 3$ ; Hirnblutung,  $n = 1$ . Die 2-Jahres-Wahrscheinlichkeit von Gesamtüberleben war 45% (95% CI 27% - 63%).

## 4. Diskussion

Das STF ist eine seltene Komplikation der allo-SZT, die mit einer erhöhten Mortalität aufgrund der Entwicklung schwerer infektiöser und hämorrhagischer Komplikationen einhergeht. Wir haben hier eine Analyse von 32 solcher Patienten durchgeführt, die einen CD34<sup>+</sup>-selektierten SZB ohne zusätzliche Konditionierung erhielten. Bei der Mehrheit der Patienten traten folgende Faktoren auf, die mit STF assoziiert waren: myeloproliferative Neoplasien, vorherige Alloimmunisierung, ABO-Inkompatibilität, Transplantate von Fremdspender, positiver CMV-Empfänger-Serostatus, Konditionierung mit reduzierter Intensität oder T-Zellen-Depletion.

Ziel der Studie war es, die Wirksamkeit des CD34<sup>+</sup>-selektierten SZB hinsichtlich der Kinetik des Ansprechens, Rate des Ansprechens und Stabilität des Ansprechens sowie der Toxizitäts- und Überlebensrate zu evaluieren.

Erstens beobachteten wir ein Ansprechen in 81% (davon *hA*,  $n = 7$ , 22%). Die mittlere Zeit bis zur Ansprechen betrug 25 Tage (14 - 874). Obwohl der Bereich des Intervalls bis zum Ansprechen weit verbreitet war, entwickelte die Mehrheit der Patienten (20/32; 65%) in den ersten Monaten nach dem Boost eine hämatologische Verbesserung. Interessanterweise sprachen die Empfänger von Familienspendern früher an als die Patienten, die Boosts von Fremdspendern erhielten. Wir haben keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der Ansprechrate und der Dosis von CD34<sup>+</sup>- oder CD3<sup>+</sup>-Zellen gesehen. In Bezug auf die hämatologische Antwort beobachteten wir, dass die Patienten, die angesprochen haben, jünger waren (39 vs. 54,  $p = 0.041$ ) und erhielten Boosts auch von jüngeren Spendern (35 vs. 43,  $p = 0.036$ ) als die ohne Ansprechen.

Die veröffentlichten Studien, wo CD34<sup>+</sup>-selektierter SZB verwendet wurde, zeigten vergleichbare Ergebnisse zur aktuellen Studie (s. Tabelle 4). (Mohty et al. 2000, Milone et al. 2005, Oyekunle et al. 2006) Zum Beispiel, berichteten Larocca *et al.*, die 20 Patienten nach CD34<sup>+</sup>-selektiertem SZB ( $n = 20$ ) analysiert hatten, dass die Mehrheit von denen (80%) die Kriterien der kompletten hämatologischen Antwort am Tag +30 nicht erfüllt hatten. Dies entspricht einer Ansprechrate von 25% am Tag +30 in unserer Studie. Im Gegensatz zu unserer Studie waren die Autoren nicht in der

Lage, den Einfluss des Spendertyps, des Patienten- und Spenderalters auf das Ansprechen zu beobachten. (Larocca et al. 2006) Die später veröffentlichte Studie von derselben Gruppe Studie mit 41 Patienten zeigte ähnliche Ergebnisse. (Stasia et al. 2014)

Zweitens war die Inzidenz von akuten (Tag + 100) und chronischen GvHD (1 Jahr) akzeptabel: 17% bzw. 26%. Die Patienten, die eine akute GvHD entwickelten, erhielten eine signifikant höhere mittlere CD3<sup>+</sup>-Dosis im Vergleich zu Patienten ohne GvHD ( $32 \times 10^3$  CD3<sup>+</sup>/kg KG vs.  $8 \times 10^3$  CD3<sup>+</sup>/kg KG,  $p=0.02$ ). Darüber hinaus war die Gesamt-GvHD-Rate in unserer Studie im Vergleich zu der nach einer zweiten allo-SZT (40%-60%) (Guardiola et al. 2000, Chewing et al. 2007, Jabbour et al. 2007) oder nach der Verabreichung eines nicht-modifizierten SZBs (30%-50%) deutlich geringer. (Remberger et al. 1998, Min et al. 2000) In einer vergleichbaren Studie, zeigten die Autoren einen Trend zur Senkung der aGvHD-Rate bei Patienten nach CD34<sup>+</sup>-selektierten SZB im Vergleich zu Empfängern der nicht-modifizierten SZBs (0% vs. 21%;  $p = 0.06$ ). (Larocca et al. 2006) Interessante Ergebnisse wurden in der Studie von Haen *et al.* gezeigt. Hier haben 55% der Patienten einen CD34<sup>+</sup>-selektierten SZB von HLA-nicht-identen Spendern erhalten, allerdings blieb die GvHD Rate am niedrigsten im Vergleich zu anderen Studien, einschließlich unserer. Die Autoren diskutieren diesbezüglich die Rolle der CD3<sup>+</sup> Zellzahl im SZB, was wir in aktueller Studie beobachtet haben. Die höhere CD34<sup>+</sup> Zellzahl in der zitierten Studie könnte auch zur gebesserten hämatologischen Rekonstitution führen. (Haen et al. 2015)

Das 2-jährige Gesamtüberleben von 45% in unserer Studie war akzeptabel, aber nicht optimal. Die *hV* war marginal mit einem gebesserten Überleben assoziiert (HR 2.7,  $p = 0.08$ ). Obwohl GvHD eine wichtige Todesursache blieb (vier von 16 Todesfällen, 25%, waren auf GvHD zurückzuführen), waren die Haupttodesursachen schwere Infektionen (8 von 16 Todesfällen, 50%).

**Tabelle 4:** Ergebnisse der Studien mit Verwendung eines CD34<sup>+</sup>-selektierten SZB.

Referenz/ Patientenzahl	Spender	Zellzahl	Ansprechen	aGvHD (Grad II-IV)	Überleben
Stasia <i>et al.</i> n=41	MRD, 29% MMRD, 27% MUD, 34% MMUD, 0% Haplo, 0%	$3.4 \times 10^6$ /kg CD34 <sup>+</sup> $0.6 \times 10^4$ /kg CD3 <sup>+</sup>	75%	15%	63% (3J)
Haen <i>et al.</i> n=20	MRD, 0% MMRD, 0% MUD, 40% MMUD, 55% Haplo, 5%	$4.6 \times 10^6$ /kg CD34 <sup>+</sup> $0.2 \times 10^4$ /kg CD3 <sup>+</sup>	92%	5%	53% (3J)
Askaa <i>et al.</i> n=18	MRD, 33% MMRD, 0% MUD, 57% MMUD, 11% Haplo, 0%	$4.9 \times 10^6$ /kg CD34 <sup>+</sup> $1.1 \times 10^4$ /kg CD3 <sup>+</sup>	72%	22%	48% (2J)
aktuelle Studie, n=32	MRD, 34% MMRD, 0% MUD, 47% MMUD, 19% Haplo, 0%	$3.4 \times 10^6$ /kg CD34 <sup>+</sup> $0.9 \times 10^4$ /kg CD3 <sup>+</sup>	81%	19%	45% (2J)

MRD, „matched related donor“ (=HLA idente Familienspender); MMRD, „mismatched related donor“ (=HLA nicht idente Familienspender), MUD, „matched unrelated donor“ (=HLA idente Fremdspender), MMUD, „mismatched unrelated donor“ (=HLA nicht idente Fremdspender), Haplo, haploidente Spender.

## 5. Schlußfolgerungen:

- STF stellt eine seltene, allerdings lebensbedrohliche Komplikation nach allo-SZT dar.
- Applikation von CD34<sup>+</sup>-selektierten SZB ohne Chemo(Immun)therapie führt zu einem hohen, schnellen (innerhalb von den ersten 2 Wochen) und dauerhaft stabilen Ansprechen.
- Die besten Ergebnisse beziehen sich auf junger Empfänger (<40 Jahre alt), die die SZBs von jeweils jungen Familienspender (<40 Jahre alt) erhalten.
- Die CD3<sup>+</sup> Zellzahl in der SZB spielt für die Entwicklung der GvHD eine kritische Rolle.
- Eine weitere Verbesserung des CD34<sup>+</sup>-Selektionsverfahrens (z.B. CD3<sup>+</sup> Depletion) für die Weiterentwicklung magnetsortierender Zellsortierungstechnologien bleibt von Interesse.

## 6. Literaturverzeichnis

Alchalby H, Yunus DR, Zabelina T, Ayuk F, Kröger N (2016) Incidence and risk factors of poor graft function after allogeneic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Bone Marrow Transplant.* 51(9):1223-1227.

Bensinger WI (2010) High-dose Preparatory Regimens. In: Thomas's Hematopoietic Cell Transplantation. A John Wiley and Sons, Ltd., Publication, Wiley-Blackwell, Singapore, 316-332.

Blume KG, Krance RA (2010) The Evaluation and Counseling of Candidates for Hematopoietic Cell Transplantation. In: Thomas's Hematopoietic Cell Transplantation. A John Wiley and Sons, Ltd. Publication, Wiley-Blackwell, Singapore, 445-460.

Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR, Bowden RA, Huang ML, Myerson D, Stevens-Ayers T, Flowers ME, Cunningham T, Corey L (2003) Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood* 101:407–414.

Brown JMY (2010) Fungal Infection after Hematopoietic Cell Transplantation. In: Thomas's Hematopoietic Cell Transplantation. A John Wiley and Sons, Ltd. Publication, Wiley-Blackwell, Singapore, 1346-1366.

Broxmeyer HE, Smith FO (2010) Cord Blood Hematopoietic Cell Transplantation. In: Thomas's Hematopoietic Cell Transplantation. A John Wiley and Sons, Ltd. Publication, Wiley-Blackwell, Singapore, 559-576.

Busca A, de Fabritiis P, Ghisetti V, Alice T, Mirabile M, Gentile G, Locatelli F, Falda M (2007) Oral valganciclovir as preemptive therapy for cytomegalovirus infection post allogeneic stem cell transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* 9:102–107

Calmettes C, Vigouroux S, Tabrizi R, Milpied N (2011) Romiplostim (AMG531, Nplate) for secondary failure of platelet recovery after allo-SCT. *Bone Marrow Transplant.* 46(12):1587-1589.

Chao NJ, Sullivan KM (2010) Pharmacologic Prevention of Acute Graft-versus-Host Disease. In: Thomas's Hematopoietic Cell Transplantation. A John Wiley and Sons, Ltd. Publication, Wiley-Blackwell, Singapore, 1257-1274

Confer DL, Miller JP, Chell JW (2010) Bone Marrow and Peripheral Blood Cell Donors and Donor Registries. In: Thomas's Hematopoietic Cell Transplantation. A John Wiley and Sons, Ltd. Publication, Wiley-Blackwell, Singapore, 544-558

Champlin RE, Horowitz MM, van Bekkum DW, Camitta BM, Eifgen GE, Gale RP, Gluckman E, Good RA, Rimm AA, Rozmann C (1989) Graft failure following bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: risk factors and treatment results. *Blood.* 73(2):606-613.

Chewning JH, Castro-Malaspina H, Jakubowski A, Kernan NA, Papadopoulos EB, Small TN, Heller G, Hsu KC, Perales MA, van den Brink MR, Young JW, Prockop

SE, Collins NH, O'Reilly RJ, Boulard F (2007) Fludarabine-based conditioning secures engraftment of second hematopoietic stem cell allografts (HSCT) in the treatment of initial graft failure. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 13(11):1313-1323.

Cutler C, Antin JH (2010) Manifestations and Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease. In: Thomas's Hematopoietic Cell Transplantation. A John Wiley and Sons, Ltd. Publication, Wiley-Blackwell, Singapore, 1287-1303

Davies SM, Kollman C, Anasetti C, Antin JH, Gajewski J, Casper JT, Nademanee A, Noreen H, King R, Confer D, Kernan NA (2000) Engraftment and survival after unrelated-donor bone marrow transplantation: a report from the national marrow donor program. *Blood.* 96(13):4096-4102.

Dyba J, Tinmouth A, Bredeson C, Matthews J, Allan DS (2016) Eltrombopag after allogeneic haematopoietic cell transplantation in a case of poor graft function and systematic review of the literature. *Transfus Med.* 26(3):202-207.

Ferrara JLM, Antin JH (2010) The Pathophysiology of Graft-versus-Host Disease. In: Thomas's Hematopoietic Cell Transplantation. A John Wiley and Sons, Ltd. Publication, Wiley-Blackwell, Singapore, 208-221

Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, Martin P, Chien J, Przepiora D, Couriel D, Cowen EW, Dinndorf P, Farell A, Hartzman R, Henslee-Downey J, Jacobsohn D, McDonald G, Mittleman B, Rizzo JD, Robinson M, Schubert M, Schültz K, Shulman H, Tumer M, Vogelsang G, Flowers ME (2005) National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 11(12):945-956.

Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz M, Hurley C, Kollman C, Anasetti C, Noreen H, Begovich A, Hildebrand W, Petersdorf E, Schmeckpeper B, Setterholm M, Trachtenberg E, Williams T, Yunis E, Weisdorf D (2004) Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood.* 104(7):1923-1930.

Gaya A, Urbano-Ispizua A, Fernandez-Aviles F, Salamero O, Roncero JM, Rovira M, Martínez C, Talarn C, Granell M, Carreras E, Montserrat E (2008) Anemia associated with impaired erythropoietin secretion after allogeneic stem cell transplantation: incidence, risk factors, and response to treatment. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 14(8):880-887.

Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED (1974) Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation.* 18 (4):295-304.

Guardiola P, Kuentz M, Garban F, Blaise D, Reiffers J, Attal M, Buzyn A, Lioure B, Bordigoni P, Fegueux N, Tanguy ML, Vernant JP, Gluckman E, Socié G (2000) Second early allogeneic stem cell transplantations for graft failure in acute leukaemia,

chronic myeloid leukaemia and aplastic anaemia. French Society of Bone Marrow Transplantation. Br.J.Haematol. 111(1):292-302.

Haen SP, Schumm M, Faul C, Kanz L, Bethge WA, Vogel W (2015) Poor graft function can be durably and safely improved by CD34<sup>+</sup>-selected stem cell boosts after allogeneic unrelated matched or mismatched hematopoietic cell transplantation. J Cancer Res Clin Oncol. 141(12):2241–2251

Ho DY, Arvin AM (2010) Varicella-zoster Virus Infections. In: Thomas's Hematopoietic Cell Transplantation. A John Wiley and Sons, Ltd., Publication, Wiley-Blackwell, Singapore, 1388-1409

Hsieh Ws, Ambinder RF (2010) Epstein-Barr Virus Infection. In: Thomas's Hematopoietic Cell Transplantation. A John Wiley and Sons, Ltd., Publication, Wiley-Blackwell, Singapore, 1410-1418

Ito JI (2010) Herpes Simplex Virus Infection. In: Thomas's Hematopoietic Cell Transplantation. A John Wiley and Sons, Ltd., Publication, Wiley-Blackwell, Singapore, 1382-1387

Jabbour E, Rondon G, Anderlini P, Giralt SA, Couriel DR, Champlin RE, Khouri IF (2007). Treatment of donor graft failure with non-myeloablative conditioning of fludarabine, antithymocyte globulin and a second allogeneic hematopoietic transplantation. Bone Marrow Transplant. 40(5):431-435.

Jagasia M, Zeiser R, Arbushites M, Delaite P, Gadbow B, Bubnoff NV (2010) Ruxolitinib for the treatment of patients with steroid-refractory GvHD: an introduction to the REACH trials. Immunotherapy. 10(5):391-402

Kerbauy FR, Storb R, Hegenbart U, Gooley T, Shizuru J, Al-Ali HK, Radich JP, Maloney DG, Agura E, Bruno B, Epner EM, Chauncey TR, Blume KG, Niederwieser D, Sandmaier BM (2005) Hematopoietic cell transplantation from HLA-identical sibling donors after low-dose radiation-based conditioning for treatment of CML. Leukemia.19(6):990-997.

Kerbauy DM, Gooley TA, Sale GE, Flowers ME, Doney KC, Georges GE, Greene JE, Linenberger M, Petersdorf E, Sandmaier BM, Scott BL, Sorrow M, Stirewalt DL, Stewart FM, Witherspoon RP, Storb R, Appelbaum FR, Deeg HJ (2007) Hematopoietic cell transplantation as curative therapy for idiopathic myelofibrosis, advanced polycythemia vera, and essential thrombocythemia. Biol.Blood Marrow Transplant. 13(3):355-365.

Lapidot T, Dar A, Kollet O (2005) How do stem cells find their way home? Blood.106(6):1901-1910.

Lagadinou ED, Marangos M, Liga M, Panos G, Tzouvara E, Dimitroulia E, Tiniakou M, Tsakris A, Zoumbos N, Spyridonidis A (2010) Human herpesvirus 6-related pure red cell aplasia, secondary graft failure, and clinical severe immune suppression after allogeneic hematopoietic cell transplantation successfully treated with foscarnet. Transpl Infect Dis. 12(5):437–440.

Larocca, A., Piaggio, G., Podesta, M., Pitto, A., Bruno, B., Di Grazia, C., Gualandi, F., Occhini, D., Raiola, A.M., Dominiotto, A., Bregante, S., Lamparelli, T., Tedone, E., Oneto, R., Frassoni, F., Van Lint, M.T., Pogliani, E. & Bacigalupo, A. (2006) Boost of CD34<sup>+</sup>-selected peripheral blood cells without further conditioning in patients with poor graft function following allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*, 91(7), 935– 940.

Leather HL, Wingard JR (2010) Bacterial Infections. In: Thomas's Hematopoietic Cell Transplantation. A John Wiley and Sons, Ltd., Publication, Wiley-Blackwell, Singapore, 1325-1345

Lévesque JP, Helwani FM, Winkler IG (2010) The endosteal 'osteoblastic' niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia*.24(12):1979-1992

Masouridi-Levrat S, Simonetta F, Chalandon Y (2016) Immunological Basis of Bone Marrow Failure after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 7:362

Mazo IB, Quackenbush EJ, Lowe JB, von Andrian UH (2002) Total body irradiation causes profound changes in endothelial traffic molecules for hematopoietic progenitor cell recruitment to bone marrow. *Blood*. 99(11):4182-4191.

Mickelson E, Petersdorf EF (2010) Histocompatibility. In: Thomas's Hematopoietic Cell Transplantation. A John Wiley and Sons, Ltd., Publication, Wiley-Blackwell, Singapore, 145-162

Milone G, Tornello A, Leotta S, Poidomani M, Mercurio S, Farsaci B, Consoli C, Murgano P, Giustolisi R (2005) CD34<sup>+</sup> selected haematopoietic stem cell (HSC) not preceded by any immunosuppressive therapy as effective treatment for graft failure. *Bone Marrow Transplant*. 35(5):521-522.

Min CK, Kim DW, Lee JW, Min WS, Kim CC (2000) Additional stem cell therapy for graft failure after allogeneic bone marrow transplantation. *Acta Haematol*. 104(4):185-192.

Mohty M, Faucher C, Chabannon C, Vey N, Stoppa AM, Ladaique P, Novakovitch G, Olivero S, Bouabdallah R, Gastaut JA, Maraninchi D, Blaise D (2000) CD34<sup>(+)</sup> immunoselected cells for poor graft function following allogeneic BMT. *Cytotherapy*. 2(5):367-370.

Olesen G, Tonder H, Hokland P (2000) Reduced total number of cobblestone area forming cells and in vitro stromal-cell growth in autografts from acute myeloid leukemia patients. *Cytotherapy*. 2(3):201-209.

Olsson R, Remberger M, Schaffer M, Berggren DM, Svahn BM, Mattsson J, Ringden O (2013) Graft failure in the modern era of allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation*, 48(4):537–543.

Oyekunle A, Koehl U, Schieder H, Ayuk F, Renges H, Fehse N, Zabelina T, Fehse B, Klingebiel T, Sputtek A, Zander A, Kröger N (2006) CD34<sup>+</sup>-selected stem cell



boost for delayed or insufficient engraftment after allogeneic stem cell transplantation. *Cytotherapy*. 8(4):375-380.

Pavletic SZ, Vogelsang GB (2010). Chronic Graft-versus-Host Disease: Clinical Manifestation and Therapy. In: Thomas's Hematopoietic Cell Transplantation. A John Wiley and Sons, Ltd., Publication, Wiley-Blackwell, Singapore, 1304-1324

Pearce DJ, Anjos-Afonso F, Ridler CM, Eddaoudi A, Bonnet D (2007) Age-dependent increase in side population distribution within hematopoiesis: implications for our understanding of the mechanism of aging. *Stem Cells*. 25(4):828-835.

Poon LM, Stasi AD, Popat U, Champlin RE, Ciurea SO (2013) Romiplostim for delayed platelet recovery and secondary thrombocytopenia following allogeneic stem cell transplantation. *Am J Blood Res*. 3(3): 260–264.

Remberger M, Ringden O, Ljungman P, Hägglund H, Winiarski J, Lönnqvist B, Aschan J (1998) Booster marrow or blood cells for graft failure after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 22(1):73-78.

Remberger M, Watz E, Ringden O, Mattsson J, Shanwell A, Wikman A (2007) Major ABO blood group mismatch increases the risk for graft failure after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 13(6):675-682.

Ringden O, Hassan Z, Karlsson H, Olsson R, Omazic B, Mattsson J, Remberger M (2010) Granulocyte colony-stimulating factor induced acute and chronic graft-versus-host disease. *Transplantation*. 90(9):1022-1029.

Rondón G, Saliba RM, Khouri I, Giralt S, Chan K, Jabbour E, McMannis J, Champlin R, Shpall E (2008). Long-term follow-up of patients who experienced graft failure post-allogeneic progenitor cell transplantation. Results of a single institution analysis. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 14(8):859-866

Schriber J, Agovi MA, Ho V, Ballen KK, Bacigalupo A, Lazarus HM, Bredeson CN, Gupta V, Maziarz RT, Hale GA, Litzow MR, Logan B, Bornhauser M, Giller RH, Isola L, Marks DI, Rizzo JD, Pasquini MC (2010) Second unrelated donor hematopoietic cell transplantation for primary graft failure. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 16(8):1099-1106

Stasia A, Ghiso A, Galaverna F, Raiola AM, Gualandi F, Luchetti S, Pozzi S, Varaldo R, Lamparelli T, Bregante S, van Lint MT, di Grazia C, Bacigalupo A (2014) CD34-selected cells for the treatment of poor graft function after allogeneic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 20(9):1440–1443.

Storb R, Yu C, Wagner JL, Deeg HJ, Nash RA, Kiem HP, Leisenring W, Shulman H (1997) Stable mixed hematopoietic chimerism in DLA-identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation. *Blood*. 89(8):3048-3054.

Stussi G, Muntwyler J, Passweg JR, Seebach L, Schanz U, Gmür J, Gratwohl A, Seebach JD (2002) Consequences of ABO incompatibility in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 30(2):87-93.

Warren E (2010) The Human Graft-versus-Tumor Effect – and How to Exploit it. In: Thomas's Hematopoietic Cell Transplantation. A John Wiley and Sons, Ltd., Publication, Wiley-Blackwell, Singapore, 232-247

Weaver CH, Potz J, Redmond J, Tauer K, Schwartzberg LS, Kaywin P, Drapkin R, Grant B, Unger P, Allen C, Longin K, Zhen B, Hazelton B, Buckner CD (1997) Engraftment and outcomes of patients receiving myeloablative therapy followed by autologous peripheral blood stem cells with a low CD34<sup>+</sup> cell content. *Bone Marrow Transplant.* 19(11):1103-1110.

Wolff SN (2002) Second hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of graft failure, graft rejection or relapse after allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 29(7):545–552

Wynn RF, Cross MA, Hatton C, Will AM, Lashford LS, Dexter TM, Testa NG (1998) Accelerated telomere shortening in young recipients of allogeneic bone-marrow transplants. *Lancet.* 351(9097):178-181.

Yalniz FF, Murad MH, Lee SJ, Pavletic SZ, Khera N, Shah ND, Hashmi SK (2018) Steroid refractory chronic graft-versus-host disease: cost-effectiveness analysis. *Biol. Blood Marrow Transplant.* In Press.

Zaia JA (2010) Cytomegalovirus Infection. In: Thomas's Hematopoietic Cell Transplantation. A John Wiley and Sons, Ltd., Publication, Wiley-Blackwell, Singapore, 1367-1381

## 7. Zusammenfassung – Summary

Wir haben die Ergebnisse der Anwendung eines CD34<sup>+</sup>-selektierten Stammzellboostes (SZB) ohne vorherige Konditionierung bei 32 Patienten (männlich, n=22; medianes Alter 54 Jahre; 20-69) mit schlechter Transplantatfunktion (definiert als Neutrophile  $\leq 1.5 \times 10^9/L$ , und/oder Thrombozyten  $\leq 30 \times 10^9/L$ , und/oder Hämoglobin  $\leq 8.5 \text{ g/dL}$ ) in der Studie ausgewertet. Das Medianintervall zwischen Stammzelltransplantation und Verabreichung des SZB war 5 Monate (2-228). Die Mediananzahl der CD34<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> Zellen war entsprechend  $3.4 \times 10^6/\text{kg KG}$  (0.96-8.30) und  $9 \times 10^3/\text{kg KG}$  (2-70). Hämatologische Verbesserung (Neutrophile  $> 1.5 \times 10^9/L$ , Thrombozyten  $> 30 \times 10^9/L$  und Hämoglobin  $> 8.5 \text{ g/dL}$ ) wurde in 81% der Patienten beobachtet und nach einem Median von 30 Tagen (14-120) nach Applikation notiert. Das Ansprechen der Empfänger der SZB von Familienspendern trat früher auf als bei den Empfänger der SZB von Fremdspendern (nach 20 *versus* 30 Tagen,  $p=0.04$ ). Die kumulative Inzidenz der akuten (Grad II-IV) und chronischen Spender-gegen-Wirt Reaktion nach SZB betrug entsprechend 17% und 26%. Patienten mit akuter Spender-gegen-Wirt Reaktion erhielten höher Medianzahl der CD3<sup>+</sup> Zellen. Das 2-jährige Gesamtüberlebens betrug 45%. SZB stellt eine effektive Therapieoption zur Verbesserung der schlechten Transplantatfunktion nach allo-SZT dar. Der optimale Zeitpunkt der SZB-Gabe, sowie anti-mikrobielle Prophylaxe und Prophylaxe der Spender-gegen-Wirt Reaktion benötigen allerdings weitere Abklärung.

We retrospectively analyzed outcomes of a CD34<sup>+</sup>-selected SCB without prior conditioning in 32 patients (male, n=22; median age 54 years; range, 20 to 69) with poor graft function, defined as neutrophils  $\leq 1.5 \times 10^9/L$ , and/or platelets  $\leq 30 \times 10^9/L$ , and/or hemoglobin  $\leq 8.5 \text{ g/dL}$ ). The median interval between stem cell transplantation and SCB was 5 months (range, 2 to 228). The median number of CD34<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> cells were  $3.4 \times 10^6/\text{kg}$  (0.96 to 8.30) and  $9 \times 10^3/\text{kg body weight}$  (range, 2 to 70), respectively. Hematological improvement (neutrophils  $> 1.5 \times 10^9/L$ , thrombocytes  $> 30 \times 10^9/L$  and hemoglobin  $> 8.5 \text{ g/dL}$ ) was observed in 81% of patients and noted after a median of 30 days (range, 14 to 120) after SCB. The recipients of related grafts responded faster than recipients of unrelated grafts (20 *versus* 30 days,  $p=0.04$ ). The cumulative incidence of acute (grade II to IV) and chronic graft-*versus*-host disease (GVHD) after SCB was 17% and 26%, respectively. Patients with acute GVHD received a higher median CD3<sup>+</sup> cell dose. The 2-year probability of overall survival was 45%. We suggest that SCB represents an effective approach to improve poor graft function post transplantation, but optimal timing of SCB administration, anti-infective, and GVHD prophylaxis needs further evaluation.

## 8. Erklärung der Eigenanteils an der Publikation

- Festlegung der grundlegenden klinischen Fragestellung der Promotion durch Doktorvater
- Durchführung einer ausführlichen Pubmed-Recherche zum Thema „*CD34+ selektierter Stammzellboost für die Verbesserung der schlechten Transplantatfunktion nach allogener Stammzelltransplantation*“
- Planung der Datenerhebung und Erstellen eines Patientenformulars zur Strukturierung der Datenerhebung.
- Erstellen einer Excell-Tabelle zur Datenerhebung
- Anfertigung der Projektskizze
- Durchführung der strukturierten Datenerhebung in 32 Patientenakten
- Spezifizierung der Fragestellung und Klärung von Detailspekten während der Datenerhebung und Rücksprache mit Doktorvater
- Datenanalyse: deskriptive statistische Auswertungen, Anwendung statistischer Testmethoden und Überlebenszeitanalyse.
- Formulierung eines Abstracts zur 37. Kongress der European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT)
- Poster Präsentation beim EBMT-Kongress zur Vorstellung und Diskussion der Arbeit mit Experten in Paris, Frankreich in April 2011; Titel des Posters: „*CD34+ -selected stem cell boost without additional conditioning for poor graft function after allogeneic stem cell transplantation*“

## **9. Danksagung.**

An dieser Stelle möchte ich folgenden Personen meinen besonderen Dank aussprechen, ohne deren Hilfe die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Nicolaus Kröger nicht nur für die Betreuung der Arbeit, sondern auch für seine mehrjährige Unterstützung bei dieser und anderen gemeinsamen Arbeiten. Ihre insbesondere außergewöhnlich freundliche Art, ihre mannigfachen Ideen motivierten und bereicherten mich stets. Ihre Begeisterung für die hämatologisch-onkologischen Themen und die Fähigkeit andere damit zu ermutigen, machten jedes Gespräch zu einem unvergesslichen intellektuellen Ereignis. Ich bin sehr froh auch von Ihrer klinischen Erfahrung und ausgezeichneter Menschenkenntnis als Assistenzarzt in Ihrer Klinik profitieren und lernen zu dürfen. Im weiteren, möchte ich mich auch sehr bedanken für die außergewöhnlichen Möglichkeiten, die Sie mir mit den Kongressteilnahmen, dieser und anderen Publikationen eröffnet haben. Ohne Ihre ständige Unterstützung und Erfahrung wäre dies nicht möglich gewesen.

Ich danke Prof. Dr. Ulrike Bacher für die immer hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung, sowie für ihren kritischen Diskurs. Ich danke Dir auch für die ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung für diese und andere Arbeiten. Ich habe vieles in Bezug auf die wissenschaftliche Arbeit auch von Dir gelernt.

Ferner danke ich Dr. Jean El-Cheikh und Prof. Didier Blaise für die Unterstützung bei der Datenauswertung.

Zusätzlich möchte ich bei Petra Schmidt und Birgit Ramme aus dem KMT-Sekretariat und bei allen Ko-Autoren für die zuverlässige Hilfe bei inhaltlichen und organisatorischen Fragen sowie für Diskussion in Bezug auf Inhalt und Form der Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt auch meinen Eltern, Sergey und Elena Klyuchnikov, die mir meinen bisherigen Lebensweg in dieser Form ermöglicht haben.

## **9. Lebenslauf**

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

## **10. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....