

Daniel Ribeiro  
Dr.med.

## **Untersuchungen zur funktionellen Aktivität und Rezeptorexpression von Granulozyten nach In-vivo-Exposition gegenüber Filgrastim, Lenograstim oder Pegfilgrastim**

Geboren am 30.4.1979 in Kaiserslautern  
Staatsexamen am 15.12.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin  
Doktorvater: Prof. Dr. med. S. Frühauf

Rekombinantes G-CSF wird seit etwa 20 Jahren in der Behandlung von chemotherapie-induzierten Neutropenien sowie zur Mobilisierung von peripheren Blutstammzellen im Rahmen der Stammzelltransplantation eingesetzt. Neben dem nicht glykosylierten rekombinant in E.Coli synthetisierten Filgrastim und dem glykosylierten, dem endogenen Molekül entsprechenden G-CSF, Lenograstim, wird seit kurzem eine dritte Form des Wachstumsfaktors eingesetzt: Pegfilgrastim. Dieses trägt eine Polyethylenglykolgruppe, welche dem Molekül eine größere Masse sowie Volumen gibt. Es entgeht somit der renalen Clearance, wodurch eine erheblich verlängerte Halbwertszeit resultiert. Pegfilgrastim wird im Gegensatz zur täglichen Gabe von Lenograstim und Filgrastim nur noch einmal pro Zyklus Chemotherapie appliziert. In einigen vorherigen Veröffentlichungen wurde darauf hingewiesen, dass die für den Immunstatus des Patienten wichtige Funktion der neutrophilen Granulozyten nach G-CSF-Gabe verändert sein könnte.

Ziel dieses Projektes war es, die funktionelle Aktivität der neutrophilen Granulozyten wie Chemotaxis, Radikalproduktion sowie Rezeptorexpression zu untersuchen und nach Gabe der verschiedenen G-CSF zu vergleichen. Granulozyten von insgesamt 27 Patienten mit hämatologisch-onkologischen Erkrankungen wurden vor und während G-CSF-Gabe mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. In einem kombinierten Boyden-Chamber-Assay und Under-Agarose-Assay wurden gerichtete Chemotaxis und Spontanmigration evaluiert. Ein Chemilumineszenzassay diente der Quantifizierung der reaktiven Sauerstoffspezies. Weiterhin wurden mittels FACS-Analysen die Expression verschiedener Rezeptoren untersucht sowie in einem Immunoassay die G-CSF-Serumspiegel bestimmt.

Dabei zeigte sich in der Filgrastim-Gruppe eine signifikant reduzierte chemotaktische Aktivität der Neutrophilen nach G-CSF, im Gegensatz dazu fand sich nach Lenograstim die Chemotaxis nur leicht reduziert. Patienten nach Pegfilgrastim zeigten eine starke, jedoch nicht signifikante Abnahme. Die Ergebnisse der ungerichteten Spontanmigration waren ähnlich,

jedoch etwas geringer ausgeprägt und nicht signifikant. Bei der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies fanden sich bei einer großen Streubreite ähnliche Effekte in der Filgrastim- und der Pegfilgrastim-Gruppe im Sinne einer geringen Abnahme, insgesamt jedoch keine signifikanten Effekte. In allen drei Gruppen konnten in den FACS-Analysen Abnahmen von CD10, CD11b, CD16 und CD18 sowie ein signifikanter Anstieg des LPS-Rezeptors CD14 sowie des IgG -Rezeptors FcγRI (CD64) nach G-CSF-Gabe beobachtet werden. Der Anstieg der CD64-Expression war in der Pegfilgrastim-Gruppe, welche auch die durchschnittlich höchsten Serumspiegel aufwies, signifikant stärker als in den anderen Gruppen. Ebenso war in der Lenograstim-Gruppe der Anstieg von CD14 signifikant höher im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Weiterhin fanden sich Abnahmen bez. der Selektine CD62L und CD162 in der Filgrastim, und der Lenograstim-Gruppe, die im Gegensatz zu Zunahmen in der Pegfilgrastim-Gruppe standen. Die Rezeptorveränderungen stehen v.a. im Zusammenhang mit der durch G-CSF stark verkürzten Knochenmarktransitzeit und damit reduzierten Reifungszeit der Granulozyten. Es resultieren phänotypisch unreifere Zellen. Frühe myeloische Oberflächenproteine wie CD64, welche im Laufe der normalen Reifung weitestgehend verloren gehen, waren verstärkt exprimiert; späte Rezeptoren wie CD10 oder CD16 waren reduziert. Die reduzierte Chemotaxis war einerseits eng mit einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen wie z.B. VLA-5 (CD49e) assoziiert und paßte andererseits zu einer verkürzten Transitzeit. Das dadurch resultierende unreifere Cytoskelett der Neutrophilen beeinträchtigte besonders nach Filgrastim die Chemotaxis. Unsere Daten bestätigen dies ebenso wie andere Veröffentlichungen. Patienten der Lenograstim-Gruppe weisen bei vergleichbaren Neutrophilenzahlen und Mobilisationsraten niedrigere G-CSF-Serumspiegel auf, was auf eine höhere Rezeptoraffinität zurückzuführen ist.

Basierend auf den dargestellten Ergebnissen lässt sich abschließend auf einen geringeren Einfluss von glykosyliertem G-CSF im Vergleich zu nicht-glykosyliertem (und in geringerem Ausmaß pegyliertem) G-CSF hinsichtlich Phänotyp sowie funktioneller Aktivität schließen; dabei kommt es zu reiferen, weniger beeinträchtigten Zellen, welche in ihren physiologischen Eigenschaften eher den durch körpereigenes G-CSF stimulierten Granulozyten ähneln.