

AUS DEM LEHRSTUHL bzw . DER ABTEILUNG  
FÜR PÄDIATRISCHE HÄMATOLOGIE, ONKOLOGIE UND  
STAMMZELLTRANSPLANTATION  
PROF. DR. MED. CORBACIOGLU SELIM  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

G-CSF SPIEGEL BEI KINDERN ALS INSTRUMENT ZUR UNTERSCHIEDUNG  
EINER AUTOIMMUNNEUTROPENIE UND NEUTROPENIE BENIGNER GENESE  
VON EINER HÄMATOPOETISCHER INSUFFIZIENZ

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Medizin*

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Feruzza Rozikhodjaeva*

2022



AUS DEM LEHRSTUHL bzw . DER ABTEILUNG  
FÜR PÄDIATRISCHE HÄMATOLOGIE, ONKOLOGIE UND  
STAMMZELLTRANSPLANTATION  
PROF. DR. MED. CORBACIOGLU SELIM  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

G-CSF SPIEGEL BEI KINDERN ALS INSTRUMENT ZUR UNTERSCHIEDUNG  
EINER AUTOIMMUNNEUTROPENIE UND NEUTROPENIE BENIGNER GENESE  
VON EINER HÄMATOPOETISCHER INSUFFIZIENZ

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Medizin*

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Feruzza Rozikhodjaeva*

2022

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Selim Corbacioglu

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Norbert Ahrens

Tag der mündlichen Prüfung: 25. März 2022

# **INHALTSVERZEICHNIS**

## **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

### **1. EINLEITUNG**

#### **1.1. Neutropenie**

- 1.1.1. Definition und Formen
- 1.1.2. Ursachen und Pathogenese
- 1.1.3. Klinik
- 1.1.4. Diagnostik
- 1.1.5. Therapie und Prophylaxe

#### **1.2. Hämatopoetische Wachstumsfaktoren**

- 1.2.1. Definition
- 1.2.2. G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)
  - 1.2.2.1. Definition
  - 1.2.2.2. Struktur
  - 1.2.2.3. Funktion
- 1.2.3. G-CSF Präparate
- 1.2.4. Indikation einer G-CSF-Therapie
- 1.2.5. Nebenwirkungen bei einer G-CSF-Therapie

### **2. ZIELSETZUNGEN**

### **3. MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1. Material**

- 3.1.1. Patienten - und Kontrollproben (Serum)
- 3.1.2. Geräte und Laborbedarf
- 3.1.3. Reagenzien
- 3.1.4. Software

#### **3.2. Methoden**

- 3.2.1. Patientenprobengewinnung
- 3.2.2. Kontrollprobengewinnung
- 3.2.3. Asservierung der Proben
- 3.2.4. ELISA-Test

- 3.2.4.1. Definition
- 3.2.4.2. ELISA-Vorgang im Labor
- 3.2.5. Klinische und statistische Analyse
  - 3.2.5.1. Gewinnung den klinischen Parametern
  - 3.2.5.2. G-CSF-Spiegelbestimmung mittels ELISA
  - 3.2.5.3. Gütekriterien der Messinstrumente (Objektivität, Reliabilität, Validität)
  - 3.2.5.4. Statistische Tests
    - 3.2.5.4.1. Statistische Signifikanz und P-Wert
    - 3.2.5.4.2. Varianzanalyse
    - 3.2.5.4.3. T-Test
    - 3.2.5.4.4. Sensitivität und Spezifität der Analyse
    - 3.2.5.4.5. Prädiktive Werte

## **4. ERGEBNISSE**

### **4.1. Kontrollprobenbearbeitung**

### **4.2. Patientenprobenbearbeitung**

#### 4.2.1. Klinische Parameter

#### 4.2.2. Patientengruppierung

##### 4.2.2.1. Gruppe I - Autoimmunneutropenien

##### 4.2.2.2. Gruppe II – Bildungsstörungen (hämatopoetische Insuffizienz)

### **4.3. Sensitivität und Spezifität des Verfahrens, Prädiktive Werte**

## **5. DISKUSSION**

## **6. ZUSAMMENFASSUNG**

## **7. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNISS**

### **7.1. Abbildungen**

### **7.2. Tabellen**

## **8. ANHANG**

### **8.1. Anhang 1. Einwilligungserklärung für Eltern/Erziehungsberechtigte**

- 8.2. Anhang 2. Einwilligungserklärung für Jugendliche
- 8.3. Anhang 3. Patienteninformation für Eltern/Erziehungsberechtigte
- 8.4. Anhang 4. Patienteninformation für Jugendliche
- 8.5. Anhang 5. Einwilligungserklärung für Eltern/Erziehungsberechtigte  
Kontrollgruppe
- 8.6. Anhang 6. Einwilligungserklärung für Jugendliche Kontrollgruppe
- 8.7. Anhang 7. Patienteninformation für Eltern/Erziehungsberechtigte  
Kontrollgruppe
- 8.8. Anhang 8. Patienteninformation für Jugendliche Kontrollgruppe
- 8.9. Anhang 9. Anforderung an die SPOH-Diagnostik

## **9. LITERATURVERZEICHNISS**

## **10. DANKSAGUNG**

## **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

µl – Mikroliter

ml – Milliliter

Abb. – Abbildung

AG - Antigen

AIDS - Acquired Immune Deficiency Syndrome

AIN - Autoimmunneutropenie

AK - Antikörper

ALL – Akute Lymphatische Leukämie

ALPS – Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome

AML – Akute Myeloische Leukämie

ANOVA - Analysis of variance

ARDS - Acute Respiratory Distress Syndrome

CFU - Colony-Forming Unit

CLS - Capillary Leak Syndrome

CML – Chronische Myeloische Leukämie

CMV – Zytomegalievirus

COPD - Chronic Obstructive Pulmonary Disease

CRP – C-reaktives Protein

CTCAE - Common Terminology Criteria for Adverse Events

d. h. – das heißt

EBV – Epstein-Barr-Virus

ELISA - Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

engl. - Englisch

EPO- Erythropoietin

Eppis - Eppendorf Reaktionsgefäße

etc. – et cetera

FLT3-Ligand - Fms-related Tyrosine kinase 3 Ligand

FN - Febrile Neutropenie

G-CSF- Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GM-CSF- Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor

GvHD - Graft-versus-Host Disease

GvHR - Graft-versus-Host Reaktion



hG-CSF- Human Granulocyte Colony Stimulating Factor  
HGF- Human Growth Factor  
HSV – Herpes Simplex Virus  
i.d.R. – in der Regel  
IL- Interleukin  
ITP – Immunthrombozytopenie  
KM – Knochenmark  
KMP - Knochenmarkpunktion  
M-CSF - Macrophage Colony Stimulating Factor  
MASCC - Multinational Association for Supportive Care in Cancer  
min. - Minuten  
MDS – Myelodysplastisches Syndrom  
MPN – Myeloproliferative Neoplasien  
NHL- Non-Hodgkin Lymphom  
nm – Nanometer  
NPW – negative prädiktive Werte  
PB – peripheres Blut  
PBSZ - Periphere Blutstammzellen  
PDB – Protein Data Bank  
pg/ml – Picogramm pro Milliliter  
PHOS- Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation  
PPW – positive prädiktive Werte  
rpm – revolutions per minute  
SAA – Schwere Aplastische Anämie  
sog. - sogenannte  
SPOH- Studienzentrum pädiatrische Onkologie und Hämatologie  
SZF – Stammzellfaktor  
SZT – Stammzelltransplantation  
Tab. - Tabelle  
TPO- Thrombopoietin  
UKR - Universitätsklinikum Regensburg  
U/min – Umdrehungen pro Minute  
z.B.- zum Beispiel  
Z.n. – Zustand nach

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Neutropenie

### 1.1.1. Definition und Formen

Die Neutropenie (syn. Neutrozytopenie, Granulozytopenie) beschreibt die Verminderung der neutrophilen Granulozyten im Blut. Sie ist die häufigste Form der Leukopenie, der Abnahme der Zahl der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) [1], [2].

Die Anzahl neutrophiler Granulozyten im Blut eines gesunden Menschen ist variabel und liegt altersabhängig zwischen 1.800 und ca. 8.000 Zellen pro Mikroliter ( $\mu\text{l}$ ). Bei einer neutrophilen Granulozyten Zahl bis zu 1.000 / $\mu\text{l}$  liegt eine leichte Form der Neutropenie, bei 500 bis 1.000 /  $\mu\text{l}$  – eine moderate Form und bei Zahlen unter 500 /  $\mu\text{l}$  - eine schwere Form der Neutropenie [1], [2] vor.

Der Schweregrad einer Neutropenie wird nach Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) beurteilt (Tab.1).

Schweregrad der Neutropenie nach CTCAE	
Grad 0	Neutrophile Granulozyten im Normbereich
Grad 1	1500– $\leq$ 2000 neutrophile Granulozyten/ $\mu\text{l}$
Grad 2	1000– $\leq$ 1500 neutrophile Granulozyten/ $\mu\text{l}$
Grad 3	500– $\leq$ 1000 neutrophile Granulozyten/ $\mu\text{l}$
Grad 4	<500 neutrophile Granulozyten/ $\mu\text{l}$ oder jede lebensbedrohliche Komplikation
Grad 5	jede tödliche Komplikation durch die Neutropenie

**Table 1. Schweregrad der Neutropenie nach CTCAE.**

Je nach Dauer einer Neutropenie unterscheidet man:

- **akute Neutropenie:** niedrige Zahlen der Neutrophilen bezogen auf einen kurzen Zeitraum (z. B. bei Neugeborenen)
- **transiente Neutropenie:** vorübergehende Neutropenie (z. B. bei Virusinfektionen oder nach Einnahme bestimmter Medikamente)

• **chronische Neutropenie:** Neutropenie, die länger als drei Monate anhält. Bei Kindern, bei denen die Neutrophilen Anzahl länger als 3 Monaten unter 500 /  $\mu$ l im Blut liegt - besteht eine „schwere chronische Neutropenie“. Diese kann von Geburt aus bestehen (angeborene schwere chronische Neutropenie) oder kann zu jeder Zeit im Laufe des Lebens auftreten (erworbene schwere chronische Neutropenie).

Neutrophile Granulozyten sind für die Abwehr von Infektionen wichtig und Teil des unspezifischen Abwehrsystems des Körpers. Daher kommt es bei Patienten mit einer Neutropenie leicht zu Infektionen. Die schwerste Form der Neutropenie ist die Agranulozytose [1], [2].

Eine **febrile Neutropenie** liegt bei längerer als eine Stunde anhaltendem Fieber über 38 °C oder einmaligem Fieber über 38,5 °C vor [2]. Die Mortalität bei solchen Patienten liegt bei durchschnittlich 5%, bei Niedrigrisikopatienten nur bei 1%.

Der MASCC-Score dient der Stratifizierung der Patienten mit einer febrilen Neutropenie und bezieht Risikofaktoren für Komplikationen der Neutropenie ein (Tab.2).

<b>Risikoscore nach MASCC</b>	
<b>Charakteristika</b>	<b>Punkte</b>
Keine oder nur milde Symptome	5
Moderate Symptome	3
Schwere Symptome	0
Keine Hypotonie	5
Keine Dehydratation	4
Solider Tumor ohne Z.n. Pilzinfektion	4
Ambulanter Patient bei Fieberbeginn	3

**Tabelle 2. MASCC-Risikoscore (Multinational Association for Supportive Care in Cancer) der Komplikationen mit der Neutropenie bei Kindern).** Eine MASCC-Score unter 21 definierten Patienten mit einem niedrigen Risiko für Komplikationen bei der Neutropenie, eine MASCC-Score über 21 – Patienten mit hohem Risiko für Komplikationen bei der Neutropenie [3].

### 1.1.2. Ursachen und Pathogenese

Neutropenien können mehrere Ursachen haben. Die meisten sind immunologisch bedingt (sogenannte Autoimmunneutropenien (AIN)) und verlaufen harmlos. In ca. 60% der Fälle kann man den Granulozyten-reaktive Autoantikörper nachweisen. Das humane neutrophile Antigen (HNA) - System ist ein polymorphes System, das fünf Antigengruppen mit unterschiedlichen Polymorphismen umfasst. In AIN sind Antikörper hauptsächlich gegen HNA-1 (oder gegen ein spezifisches Allel von HNA-1) und HNA-4 gerichtet [4]. Das Knochenmark ist typischerweise normozellulär oder hyperzellulär, mit einer variabel verminderten Anzahl segmentierter Granulozyten [5]. Wenn es sich um eine Bildungsstörung handelt (sogenannte hämatopoetische Insuffizienz) liegen häufig schwere angeborene oder erworbene Defekte zugrunde, die zu tödlich verlaufenden Infektionen führen können und eine absolute Indikation für eine Stammzelltransplantation darstellen [6]. Bei manchen Patienten bleibt die Ursache ungeklärt. Es wird dann von einer „idiopathischen Neutropenie“ gesprochen. Das Knochenmark kann z.B. bei intensiver Antibiotika-Therapie oder bei Chemotherapie angegriffen sein. Aber auch giftige Pflanzen, manche Giftschlangen und andere giftige Chemikalien können als Auslöser in Frage kommen. Bei Organtransplantation ist eine Unterdrückung des Immunsystems ausdrücklich gefordert, um die Intensität von Abstoßungsreaktionen des Körpers zu minimieren. In solchen Fällen wird auch eine medikamentös-bedingte Neutropenie in Kauf genommen.

Die Ursachen erworbener Bildungsstörungen können infektiöse (z.B. Infektionen mit Zytomegalievirus (CMV), Epstein-Barr-Virus (EBV), Herpes Simplex Virus (HSV)), neoplastische (z. B. akute lymphatische Leukämie (ALL), akute myeloische Leukämie (AML), chronische myeloische Leukämie (CML), Myelofibrose) oder immunbedingte Knochenmarksschädigungen sein. Sie kann durch einen arretierten Entwicklungszyklus oder durch reduzierte Knochenmarksfreisetzung trotz ausreichender Bildung begründet sein [2], [7], [8], [9].

Bei einer akuten Entzündung werden neutrophile Granulozyten in starkem Maße verbraucht. Wenn der Bedarf dabei die Bildungskapazität im Knochenmark übersteigt, kommt es zu einer Abnahme der Zellzahl im Blut. Dabei kann gleichzeitig eine Linksverschiebung auftreten, weil nur noch unreife Neutrophile und Metamyelozyten (Vorläuferzellen der Neutrophilen) freigesetzt werden [2], [9]. Dies

passiert bei sehr schweren Allgemeinerkrankungen wie Sepsis, Peritonitis und anderen.

Bei angeborenen Neutropenien können krankhaft veränderten Gene, die eine Störung der Blutbildung verursachen, zugrunde liegen und auf unterschiedliche Arten vererbt werden (z.B. autosomal-rezessiv, autosomal-dominant, X-chromosomal oder sporadisch (z.B. Kostmann-Syndrom, Myelokathexis, Schwachman-Diamond-Syndrom, Glykogenspeicherkrankheit Typ 1b, Barth Syndrom, nicht klassifizierte angeborene Neutropenie). Diese können durch Fehler (Mutationen) der Erbanlagen (Gene) für die Blutbildung entstehen, was isoliert auftreten kann oder begleitendes Krankheitszeichen einer anderen angeborenen Erkrankung sein [1], [9].

Somit kann eine Neutropenie durch Blutbildungs- und Blutreifungsstörungen, durch vermehrten Abbau oder durch gesteigerten Verbrauch neutrophiler Granulozyten entstehen. Eine ausführliche Auflistung möglicher Ursachen von Neutropenien ist in Tab.3 zusammengefasst.

Klassifikation	Ätiologie
Neutropenien durch intrinsische Defekte von myeloischen Zellen oder ihren Vorläufern	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immundefekte (z.B. Zyklische Neutropenie, schwere angeborene Neutropenie, Kostmann-Syndrom, x-gebundene schwere angeborene Neutropenie, Hyper-IgM-Syndrom, Griscelli-Syndrom, Retikuläre Dysgenese, Myelodysplasie)</li> <li>• Syndromassoziierte Neutropenien (z.B. Knorpel-Haar-Hypoplasie, kongenitale Dyskeratose, Glykogenspeicherkrankheit Typ IB, Shwachman-Diamond-Syndrom, Chediak-Higashi-Syndrom, Barth-Syndrom, Myelokathexis)</li> </ul>
Sekundäre Neutropenien	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AIN bei weiteren Autoimmunerkrankungen z. B. erythematodes, rheumatische Arthritis</li> <li>• Knochenmarkverdrängung (z. B. durch Krebs, Myelofibrose, Granulome)</li> <li>• Zytotoxische Chemotherapie oder Bestrahlung</li> <li>• Arzneimittelinduzierte Neutropenie</li> <li>• Folsäure- oder Vitamin-B12-Mangel</li> <li>• Hypersplenismus</li> <li>• Infektion (HIV, CMV, Parvo-B19, EBV, Hepatitis, Malaria)</li> <li>• T-γ-lymphoproliferative Krankheit</li> <li>• Transcobolaminmangel</li> <li>• Toxine</li> <li>• Schwerer kombinierter Immundefekt</li> <li>• Lymphohystiozytose</li> <li>• Hyper-IgM-Syndrom</li> </ul>

**Tabelle 3. Klassifikation der Neutropenien im Kindes- und Jugendalter.** Neutropenien werden in zwei Kategorien eingeteilt. Sie sind entweder die Folge eines intrinsischen Defektes der Knochenmarkvorläuferzellen oder liegen als sekundäre Neutropenien vor, d. h. aufgrund eines extrinsischen Faktors, der auf die Knochenmarkvorläuferzellen wirkt [7], [10], [11].

Während der Kindheit ist die primäre Autoimmunneutropenie (AIN) die häufigste Diagnose, während die sekundäre Neutropenie im Erwachsenenalter überwiegt [12].

### 1.1.3. Klinik

Durch die Erniedrigung der Zahl der neutrophilen Granulozyten wird eine vorübergehende Unterdrückung des Immunsystems hervorgerufen. Ausmaß und Dauer der Neutropenie und somit das Risiko von Infektionen hängen auch von der Art und Ursache der Schädigung ab [2].

Je niedriger die Zahl der weißen Blutkörperchen ist, desto höher ist das Risiko für eine Infektion. Die Neutropenie selbst ist bis zum Auftreten von Infektionen asymptomatisch. Fieber ist häufig der einzige Hinweis auf eine vorliegende Infektion. Häufige Infektionen von Kindern und Jugendlichen mit Neutropenie sind zum Beispiel Mittelohrentzündungen, Mandelentzündungen (Tonsillitiden), Schleimhautentzündungen (insbesondere im Mund) und Entzündungen der Haut (Hautabszesse). Diese Infektionen können bei Kindern mit schwerer chronischer Form der Neutropenie lebensbedrohlich werden.

Fieber, das heißt eine Körpertemperatur über 38,5 °C, ist in der Regel Anzeichen für eine Infektion. Aufgrund der Abwehrschwäche von Kindern und Jugendlichen mit Neutropenie stellt jede Infektion einen Notfall dar. Deshalb muss bei den geringsten Anzeichen für eine Infektion, wie Fieber, Halsschmerzen, Ohrenschmerzen, Husten, Kopfschmerzen, Erbrechen oder Bauchschmerzen, unbedingt und schnell ein Arzt aufgesucht werden.

Je früher eine Infektion behandelt werden kann, desto größer ist der Therapieerfolg und desto kleiner das Risiko für bleibende Folgeschäden. Je nachdem, ob und mit welcher anderen Erkrankung die Neutropenie einhergeht, können zusätzliche Krankheitszeichen vorliegen. Die Behandlung der Neutropenie ist wegen der verschiedenen Formen dieser Erkrankung sehr unterschiedlich. Während bei einigen Patienten nur gelegentlich Infektionen auftreten, leiden andere unter länger andauernden (chronischen) Infekten.

AIN tritt vorwiegend im Alter von 6 bis 24 Monaten auf und trotz schwerer Neutropenie besteht die Symptomatik in 90% der Fälle aus leichten Infektionen. Schwere bakterielle Infektionen können auftreten und einige Patienten können daher von der Behandlung mit prophylaktischen Antibiotika oder Granulozytenwachstumsfaktor profitieren. Doch die Mehrzahl der Patienten mit AIN zeigt einen gutartigen klinischen Verlauf und braucht weder eine Antibiotikaphylaxe noch eine umfassende medizinische Betreuung [13]. Spontane

Remission treten bei ca. 95% der Patienten innerhalb von ein paar Jahren nach dem Zeitpunkt der Diagnose auf [14].

Bei Patienten mit einer arzneimittelinduzierten Neutropenie aufgrund einer Hypersensitivitätsreaktion können als klinische Zeichen Fieber und Exanthem auftreten.

Einige Patienten mit einer chronischen, autoimmun-bedingten Neutropenie und Neutrophilenzahlen unter 200 /  $\mu$ l entwickeln nur selten eine schwere Infektion.

Patienten mit zyklischer Neutropenie, schwerer kongenitaler Neutropenie und Neutropenie bei Knochenmarkbildungsstörungen leiden hingegen häufiger an oralen Ulzerationen, Stomatitis, Pharyngitis, Lymphknotenvergrößerungen, Phlegmone, Leberabszesse und Furunkulose in den Phasen der schweren chronischen Neutropenie. Oftmals treten Pneumonien und Septikämien auf [5].

Folgende Faktoren bestimmen den Krankheitsverlauf bei einer schweren chronischen Form einer Neutropenie:

- Form der Neutropenie: Patienten mit einer schweren angeborenen Neutropenie zeigen in der Regel schwerere Krankheitsverläufe als Patienten mit einer erworbenen Neutropenie. Hinzu kommt, dass bei vielen der angeborenen Erkrankungen, die regelmäßig mit einer schweren Neutropenie beginnen, zusätzlich noch weitere Organfunktionen gestört sind. Bei diesen Kindern und Jugendlichen wird der Gesamtverlauf nicht nur durch den Mangel an weißen Blutkörperchen, sondern auch dadurch bestimmt, inwieweit diese anderen Störungen erfolgreich behandelt werden können.
- Zeitpunkt der Diagnosestellung/des Behandlungsbeginns: ein frühzeitiges Erkennen der Neutropenie und ein früher Behandlungsbeginn wirken sich positiv auf den Krankheitsverlauf aus.
- Qualität der Gesamtversorgung: Zur optimalen Versorgung von Kindern und Jugendlichen mit einer schweren chronischen Neutropenie gehört die Behandlung durch Experten in einem Spezialzentrum für Kinderblutkrankheiten (Klinik für pädiatrische Hämatologie) in enger Zusammenarbeit mit den niedergelassenen Haus- und Kinderärzten. Ebenso ist eine umfassende Aufklärung und Mitarbeit seitens der Betroffenen und ihrer Angehörigen Voraussetzung für einen günstigen Krankheitsverlauf [9].



#### **1.1.4. Diagnostik**

Kinder und Jugendliche, die häufig an wiederholten oder ungewöhnlichen Infektionen leiden sollten sich unbedingt beim Kinderarzt vorstellen. Anhand der Krankheitsgeschichte und nach körperlicher Untersuchung des Patienten bei Verdacht auf eine Neutropenie oder auf eine der Erkrankungen, die mit einer solchen einhergehen können, wird ein „großes Blutbild“ oder auch "Differentialblutbild" veranlasst. Wenn der Verdacht auf Vorliegen einer Neutropenie bestätigt wird können weitere Untersuchungen je nach Klinik notwendig sein, z.B. Abklärung einer Infektion mit Kulturen, Serologie, Knochenmarkpunktion (KMP) und Bildgebung (Ultraschall, MRT, etc.).

Bei Patienten mit AIN können in einigen Fällen Antikörper gegen weiße Blutzellen (Granulozytenspezifische Antikörper) nachgewiesen werden. Diese treten häufigsten im Kleinkindesalter auf und verschwinden spontan im jungen Schulalter.

Wenn im Differenzialblutbild eine Neutropenie ohne Nachweis von Antikörpern gegen Granulozyten besteht, muss weiter nach der Ursache der Neutropenie gesucht werden. Bei Verdacht auf hämatopoetische Insuffizienz wird das Knochenmark untersucht. Bei einer Knochenmarkuntersuchung wird das Aussehen und das Erbmateriale (Chromosomen, Gene) von Blutzellen und deren Vorstufen unter dem Mikroskop und mittels molekulargenetischen Techniken untersucht [15].

#### **1.1.5. Therapie und Prophylaxe**

Die Therapie richtet sich nach der Grunderkrankung. Die Behandlungen der Neutropenie für Kinder und Jugendliche haben das Ziel die Bildung von Granulozyten zu steigern und die gesundheitlichen Probleme wie die erhöhte Anfälligkeit für Infektionen zu kontrollieren.

Die Therapie der asymptomatischen Neutropenie beinhaltet eine prophylaktische antibiotische, antimykotische und antivirale Therapie in Abhängigkeit von Neutrophilenzahl, Ursache der Neutropenie und des klinischen Zustandes.

Bei der Mehrzahl der Patienten mit AIN ist jedoch keinerlei Therapie erforderlich, da trotz der Neutropenie im Blutbild eine ausreichende Zahl von Granulozytenstufen im Knochenmark vorhanden ist und somit eine ausreichende Abwehr bakterieller Infektionen vorliegt [15].

Zu den Therapien, die derzeit bei schwerer Neutropenie eingesetzt werden, gehören:

- Allgemeine Maßnahmen. Allgemeine hygienische Regeln müssen eingehalten werden (Umkehrisolation). Patienten, die eine schwere und lange anhaltende Neutropenie haben, sollten mit Mundschutz, Kittel und desinfizierten Händen behandelt werden. Oft ist eine isolierte Unterbringung in einem Einzelzimmer erforderlich.
- Gabe von Antibiotika. Bei Verdacht auf eine Infektion sollte unverzüglich eine Therapie mit einem Breitspektrumantibiotika erfolgen. Die Auswahl des jeweiligen Antibiotikums richtet sich nach dem Mikroorganismus, der für die Art der Infektion am ehesten verantwortlich sein kann, dem Erregerspektrum der jeweiligen Klinik und der potenziellen Toxizität der Therapie. Beim kulturellen Nachweis von Erregern sollte die Antibiotikatherapie gemäß Resistenztest angepasst werden. Pilzinfektionen sind der häufigste Grund für persistierendes Fieber und klinische Verschlechterung des Patienten. Daher sollte eine antimykotische Therapie empirisch ergänzt werden, wenn trotz Einsatz eines Breitspektrumantibiotikums über 3 bis 4 Tage hinaus unklares Fieber besteht.
- Absetzen von vermutlich auslösenden Substanzen (z. B. Arzneimittel). Besteht der Verdacht auf eine medikamenten- oder Toxin induzierte Neutropenie sollten alle potenziell auslösende Substanzen sofort abgesetzt werden.
- Gabe von Granulozyten-Kolonien stimulierendem Faktor (G-CSF), mit denen die Bildung bzw. die Ausreifung der neutrophilen Granulozyten angeregt und beschleunigt werden kann.
- Gabe von Vitaminen, Glukokortikoiden, Granulozyten-Transfusionen. Glukokortikoide, anabole Steroide und Vitamine stimulieren zwar nicht die Produktion von neutrophilen Granulozyten, können aber ihre Verteilung und ihren Abbau beeinflussen und steigern somit die Werte im peripheren Blut.
- Stammzelltransplantation (SZT, Übertragung von Stammzellen von einem Spender an einen Empfänger). Es gibt drei verschiedene Transplantationsarten: die autologe, die syngene und die allogene Stammzelltransplantation. Bei der autologen Transplantation werden dem Patienten eigene Stammzellen entnommen, und diese nach entsprechender myeloablativer Therapie dem Patienten wieder zugeführt. Die syngene Transplantation ist die seltenste Transplantationsart, die zwischen genetisch identischen Individuen (Zwillingen) durchführbar ist [8]. Die allogene Stammzelltransplantation ist die häufigste

Transplantationsart, bei der Stammzellen von einer fremden Person mit gewebeverträglichen Merkmalen übertragen werden.

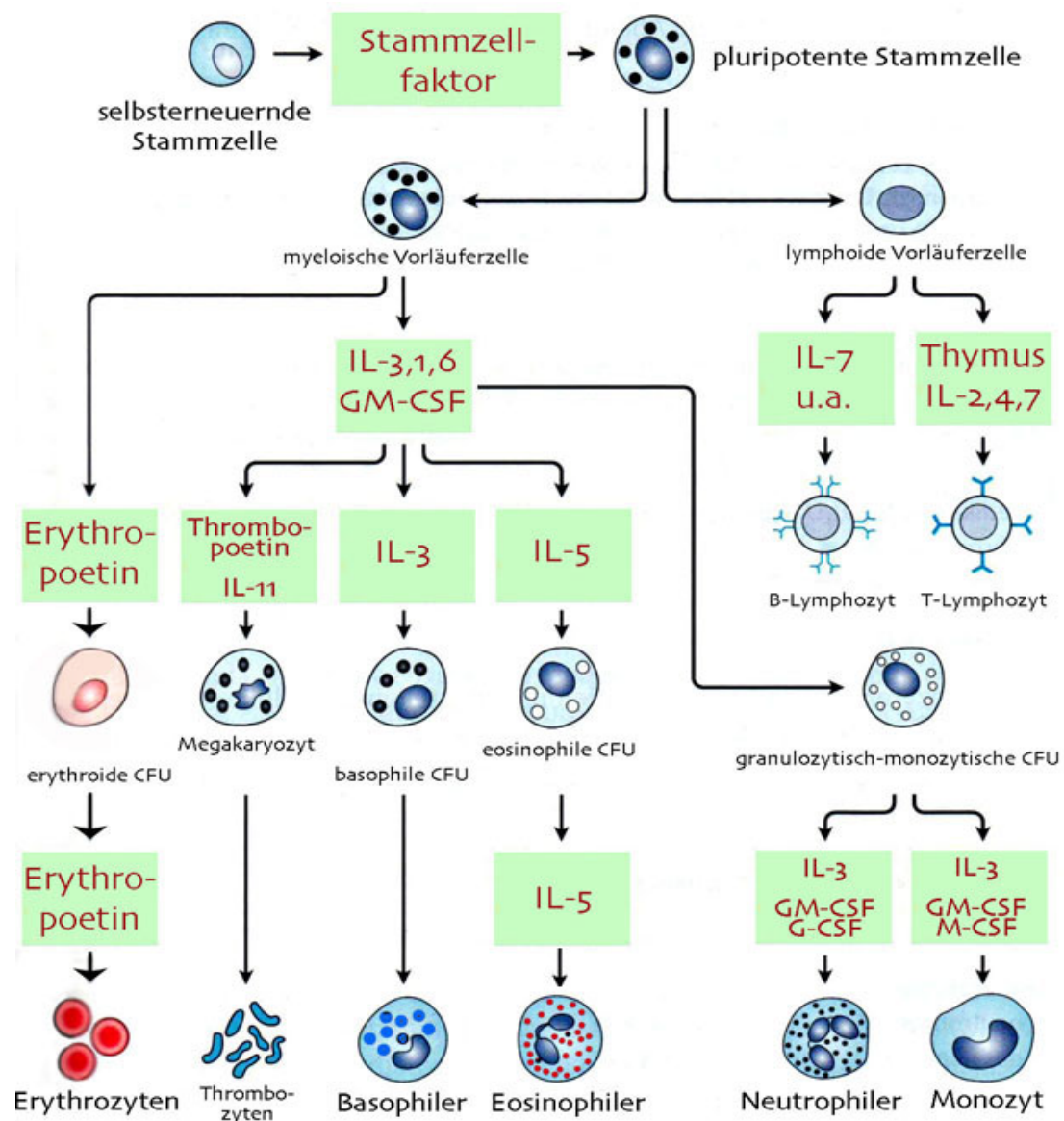
- Splenektomie. Bei Patienten mit Splenomegalie oder Sequestration von Neutrophilen in der Milz (z. B. Felty-Syndrom) kann eine Splenektomie zum Anstieg der Neutrophilenwerte führen.
- Unterstützende Maßnahmen: Krankengymnastik, Physiotherapie, Ergotherapie, Psychotherapie, etc.

## 1.2. Hämatopoetische Wachstumsfaktoren

### 1.2.1. Definition

Hämatopoetische Wachstumsfaktoren (engl. Human Growth Factor, HGF) sind spezifische Mediatoren (Glykoproteine), die die Proliferation und Differenzierung der Blutvorläuferzellen und die Funktion der reifen Blutzellen regulieren. Die biologischen Effekte dieser Wachstumsfaktoren werden durch spezifische Rezeptoren auf den Zielzellen vermittelt. Sie können lokal am Ort ihrer Bildung durch intrazelluläre Kontakte wirken oder im Plasma zirkulieren. HGF sind in verschiedenen Stadien der Hämatopoese (Blutbildung) wirksam. Der Granulozyten-koloniestimulierende Faktor (G-CSF), der Granulozyten-Monozytenkoloniestimulierender Faktor (GM-CSF), Erythropoetin (EPO) und Thrombopoetin (TPO) werden zur raschen Regeneration linienspezifischer Zellpopulationen eingesetzt [1], [16]. Interleukin-1 (IL-1), IL-3, IL-6 und IL-11 stimulieren multipotente Vorläuferzellen und aktivieren ein breites Zellspektrum. Der sogenannte Stammzellfaktor (SCF=Kit-Ligand) und der FLT3-Ligand stimulieren pluripotente Vorläuferzellen und aktivieren neutrophile Granulozyten [6],[17,18]. Somit zeigen die HGF eine Wirkung auf frühe Progenitorzellen, sowie auf weiter differenzierten Vorläuferzellen der granulozytären, erythropoetischen und trombopoetischen Reihen [19].

Abbildung 1 zeigt schematisch den proliferativen Effekt der relevanten HGF auf Progenitorzellen.



**Abbildung 1. Schematische Darstellung der Regulation der Hämatopoese durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren.** CFU „colony-forming unit“, Megakaryozyt, granulozytisch-monozytische CFU, erythroide CFU, basophile CFU, eosinophile CFU, IL Interleukin, Stammzellfaktor (STF), GM-CSF „granulocyte/macrophage colony stimulating factor“, Erythropoetin (EPO), Trombopoetin (TPO), G-CSF „granulocyte colony stimulating factor“, M-CSF „macrophage colony stimulating factor“. Quelle: PHOS Patientenaufklärung.

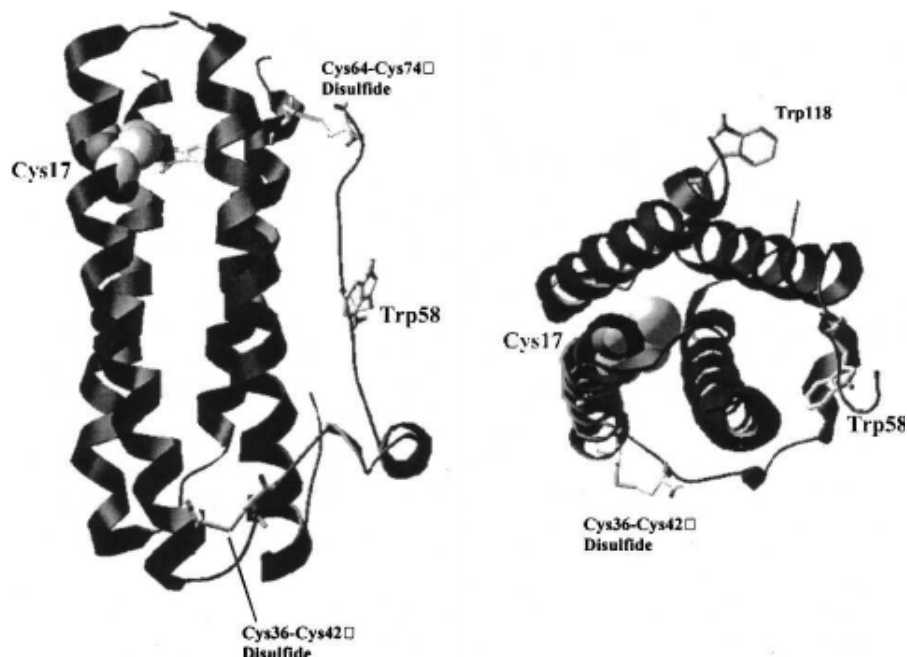
## 1.2.2. G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)

### 1.2.2.1. Definition

Der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (engl. Granulocyte-Colony Stimulating Factor, G-CSF) ist ein Peptidhormon, das als Zytokin unter anderem bei Entzündungen vom Körper ausgeschüttet wird und die Bildung und Ausschwemmung von Granulozyten anregt [20].

### 1.2.2.2. Struktur

Das humane Glykoprotein besteht aus 174 Aminosäuren [21], ist an der Hydroxygruppe des Threonin 133 glykosyliert und besitzt eine Molekülmasse von 19,6 kDa [20], [22], („UniProt P09919“). Die Glykosylierung macht etwa 4 % des Gesamtgewichts aus und besteht aus  $\alpha$ -N-Acetyl-Neuraminsäure,  $\beta$ -Galaktose und N-Acetyl-Galaktosamin. Es hat zwei Disulfidbrücken. Das humane Gen von G-CSF liegt auf Chromosom 17 im Genlocus q11.2-q12 [20], [21].



**Abbildung 2. Kristallstruktur von rekombinatem G-CSF.** Das Diagramm auf der linken Seite bietet eine Ansicht orthogonal zur langen Achse des Proteins. Auf der rechten Seite wird das Diagramm um 90° gedreht, um einen Blick auf die Achse des 4-Helix-Bündels zu geben. Die beiden nativen Disulfide (36-42 und 64-74) und die Tryptophane 58 und 118 sind als Stick-Darstellungen abgebildet. Cystein 17, das einzige freie Thiol im Protein, wird als raumfüllendes Modell gezeigt. Die Disulfidbindung 64-74 wurde aus der rechten Abbildung entfernt [23].

### 1.2.2.3. Funktion

G-CSF fördert die Bildung und Differenzierung von Vorläuferzellen der Granulopoese, aktiviert Funktionen reifer neutrophiler Granulozyten und beschleunigt deren Auswanderung aus dem Knochenmark ins Blut. Damit verringert G-CSF den Abfall der neutrophilen Granulozyten und verkürzt die Dauer einer Neutropenie nach Chemotherapiegabe [16]. Diese Wachstumsfaktoren werden in der Klinik und Forschung zur Mobilisierung peripherer Blutstammzellen (PBSZ) bei autologer und allogener SZT, zur *ex-vivo*-Kultur hämatopoetischer Stammzellen, zum Gentransfer oder zur Differenzierung in dendritische, granulozytäre oder megakaryopoetische Zellen eingesetzt [24, 25].

### 1.2.3. G-CSF Präparate

In Deutschland werden in der Medizin überwiegend gentechnisch hergestellte Varianten des G-CSFs angewendet. Der Einsatz des künstlichen G-CSF hat im Vergleich zum menschlichen G-CSF den Vorteil, dass kein Risiko einer Virusübertragung besteht. Um die Anzahl der weißen Blutzellen zu steigern, wird daher zusätzliches (als Medikament zugeführtes) G-CSF benötigt. G-CSF wird i.d.R. unter die Haut (subkutan) verabreicht. Der Zeitpunkt des Behandlungsbeginns, die G-CSF-Dosis und die Häufigkeit der Verabreichungen, die für das Ansteigen und die Aufrechterhaltung ausreichender Neutrophilen zahlen erforderlich sind, ist von der Indikation abhängig und wird vom Behandlungsteam individuell festgelegt [26].

Als Arzneistoff wird G-CSF rekombinant entweder aus CHO-Zellen (Lenograstim) bzw. aus *E. coli* (Filgrastim) hergestellt. Die Aminosäuresequenz von Filgrastim und Lenograstim ist identisch, das neuere Lenograstim ist darüber hinaus – dem natürlichen Vorbild entsprechend – an Position 133 glykosyliert [27]. Zusätzlich existiert G-CSF auch in PEGylierter Form (Lipegfilgrastim und Pegfilgrastim) [20].

#### Handelsnamen der Medikamente:

1. **Filgrastim:** Biograstim®, Filgrastim HEXAL®, Leucita®, Neupogen®, Nivestim®, Ratiograstim® [20].
2. **Lenograstim:** Granocyte®
3. **Lipegfilgrastim:** Lonquex®
4. **Pegfilgrastim:** Neulasta®

### **Medikamentenwirkung:**

1. Reduktion der infektiösen Komplikationen nach einer Chemotherapie (Krebsbehandlung);
2. Therapie der Neutropenie durch Stimulation der Granulozyten;
3. Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut (SZT).

Aufgrund ihrer vergleichsweise kurzen Halbwertszeit von circa 3,5 Stunden müssen G-CSF-Präparate wie Filgrastim (zum Beispiel Neupogen®, Ratiograstim®, Nivestim®) oder Lenograstim (zum Beispiel Granocyte®) täglich über mehrere Tage subkutan verabreicht werden, um eine Dauerstimulation auf das Knochenmark zu bewirken. Durch zusätzliche Pegylierung des rekombinanten Filgrastim (Pegfilgrastim®, Neulasta®) wird der Abbau deutlich verlangsamt (Halbwertszeit: circa 33 Stunden). Eine einmalige Gabe subkutan 24 bis 72 Stunden nach verabreichter Chemotherapie ist somit völlig ausreichend [28], [29].

#### **1.2.4. Indikationen einer G-CSF-Therapie**

Der Einsatz von gentechnologisch hergestellten hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie G-CSF versprach einen großen Fortschritt in der Supportivtherapie von Patienten mit angeborener- oder erworbener Neutropenie. Basierend auf den Ergebnissen zahlreicher Studien wurden in den letzten Jahren Leitlinien für den rationalen Einsatz der teuren Wachstumsfaktoren erstellt [30]. In Deutschland wurden diese von Fachgesellschaften entwickelt und geben den Ärzten wichtige Anhaltspunkte für die Krebstherapie. Dazu gehören die Leitlinie "Hämatopoetische Wachstumsfaktoren" vom Arbeitskreis Supportive Maßnahmen der Onkologie der Deutschen Krebsgesellschaft ([www.onkosupport.de](http://www.onkosupport.de)) vom Januar 2006, weiter "Behandlung mit hämatopoetischen Wachstumsfaktoren", herausgegeben von der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie ([www.dgho.de](http://www.dgho.de)).

In der folgenden Tabelle wird eine Klassifikation und Indikation der Therapie mit G-CSF im Überblick vorgestellt (Tab.4).



<b>Indikationen zur Therapie mit G-CSF und entsprechende Klassifikation.</b>
<b>Klasse I: Eindeutige Indikation, allgemein akzeptiert, als nützlich und effektiv bewertet, Anwendung empfohlen</b>
Mobilisation hämatopoetischer Progenitor- und Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut (autolog und allogene)
<b>Klasse II: Akzeptable Indikationen</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Initiale Prophylaxe nach mäßig myelotoxischer zytostatischer Chemotherapie: erwartete Neutropeniedauer (&lt;500 Neutrophile/<math>\mu</math>l) von 5-7 Tagen und Vorliegen von Risikofaktoren (Abb.4), erwartetes Risiko der febrilen Neutropenie von &gt;20%</li> <li>• Sekundäre Prophylaxe nach zytostatischer Chemotherapie, wenn nach dem ersten Kurs eine Neutropenie (&lt;500 Neutrophile/<math>\mu</math>l) mit einer Dauer von &gt;5 Tagen aufgetreten ist</li> <li>• Nach myeloablativer Therapie und allogener oder autologer Knochenmarktransplantation</li> <li>• Aplastische Anämie</li> <li>• Haarzelleukämie</li> <li>• Nach myeloablativer Therapie und autologer oder allogener Transplantation peripherer Blutstammzellen</li> </ul>
<b>Klasse III: Möglicherweise sinnvolle Indikationen</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stimulation myeloischer Blasten vor zytostatischer Chemotherapie</li> <li>• Therapie der Neutropenie nach Strahlentherapie</li> <li>• Autoimmunneutropenie</li> <li>• Neutropenie bei myelodysplastischem Syndrom (MDS) (nicht prophylaktisch)</li> <li>• Begleittherapie zur Leukozyten Transfusionen</li> </ul>

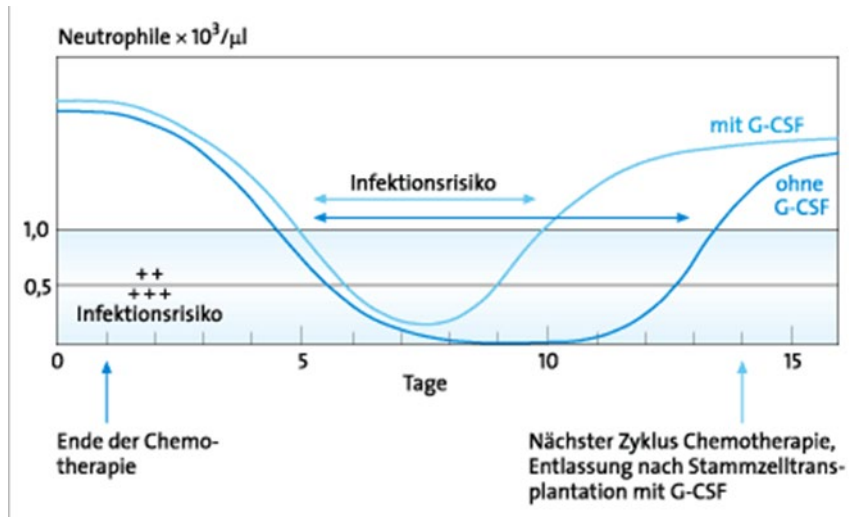
**Tabelle 4. Indikationen zur Therapie mit G-CSF und entsprechende Klassifikation.** Die Indikation für die G-CSF Gabe wurde in 3 Klassen unterteilt. Klasse I- Eindeutige Indikation. Klasse II- Akzeptable Indikationen. Klasse III- Möglicherweise sinnvolle Indikationen [30].

Um das Risiko schwerer infektiöser Komplikationen bei krebserkrankten Patienten zu verringern, wird der Einsatz von G-CSF bei einer Untergruppe von Patienten kurz nach Gabe der zytotoxischen Therapie oder nach Knochenmark- oder Stammzelltransplantation empfohlen. So profitieren Kinder mit sehr intensiver Chemotherapie, wie z. B. Hochrisikopatienten mit ALL oder Non-Hodgkin Lymphom (NHL) von der Gabe der Wachstumsfaktoren, während dies für Patienten mit soliden

Tumoren noch unklar ist [30], [31]. Die Mobilisierung peripherer Stammzellen zur autologen oder allogenen Transplantation stellt ein neues und vielversprechendes Einsatzgebiet der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren dar. Während Studien zum Einsatz der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren bei Kindern mit myelodysplastischem Syndrom weitgehend fehlen, sollten Kinder mit schwerer aplastischer Anämie frühzeitig G-CSF erhalten. Ebenfalls ist die Vergabe von G-CSF bei Kindern mit schwerer chronischer Neutropenie indiziert [9], [30]. Bisher konnte keine größere Studie einen klinischen Nutzen der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren bei Früh- und Neugeborenen zeigen, so dass hier der routinemäßige Einsatz der Wachstumsfaktoren nicht empfohlen wird. Dabei muss für jede Indikationsstellung der teuren Wachstumsfaktoren der klinische und der ökonomische Nutzen mit der Einsparung der Gesamttherapiekosten kritisch gegeneinander abgewogen werden [30].

In vielen Studien ist inzwischen eindrucksvoll belegt worden, dass die Gabe von G-CSF-Präparaten nicht nur signifikant die Dauer und Schwere einer Chemotherapie-induzierten Neutropenie (Abb.3), sondern auch das Risiko kritischer febriler Phasen während der Neutropenie und somit die Notwendigkeit der notfallmäßigen stationären Aufnahme und Gabe von Breitspektrum-Antibiotika reduziert [32], [33], [34].

Die Dosierung von G-CSF für die Prophylaxe nach zytotoxischen Therapien ist am effektivsten bei 5 µg/kg/Tag und für die Mobilisierung von Stammzellen 10 µg/kg/Tag. Der Beginn der prophylaktischen Gabe des G-CSF sollte zwischen 1 und 5 Tagen nach Ende der jeweiligen Chemotherapieeinheit liegen [30], [35]. In einer randomisierten Studie bei 18 Kindern im Alter zwischen 1 und 18 Jahren mit verschiedenen Malignomen nach insgesamt 36 Chemotherapieeinheiten zeigte sich kein Unterschied in der Neutropenedauer, der Inzidenz von Fieber in Neutropenie oder der Dauer des Krankenhausaufenthaltes, wenn mit G-CSF-Gaben (5 µg/kg/Tag) nach einem oder nach 5 Tagen nach Ende der Chemotherapieeinheit begonnen wurde [36]. Die Vergabe der Wachstumsfaktoren sollten mindestens so lange fortgeführt werden, bis die absolute Neutrophilenzytenzahl 1000/µl übersteigt [30], [37], [38].

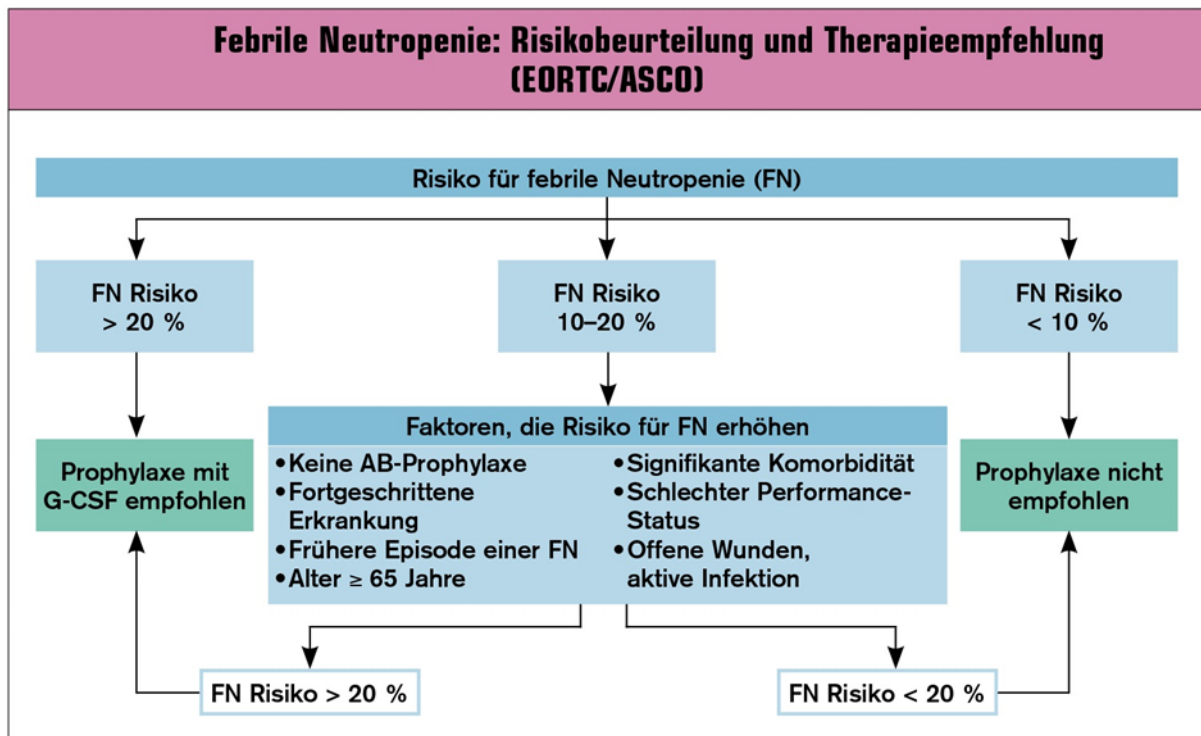


**Abbildung 3. Zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Infektionen in der Neutropenie und der Granulozytenregeneration.** Hier werden der Sturz der Neutrophilenzahl nach dem Ende der Chemotherapie und deren nachfolgenden Normalisierung in zeitlichem Zusammenhang beobachtet. Die Zeit, wo die Neutrophilenzahl unter 1000/ml ist wird mit hohem Infektionsrisiko assoziiert. Ohne G-CSF Vergabe dauert diese Zeit 8 Tage, mit G-CSF Vergabe – 5 Tage, deutlich weniger, was den protektiven Wert der G-CSF Vergabe bei absoluter Neutropenie zeigt [39].

Allerdings die hohen Tagestherapiekosten, die mit einer G-CSF- Gabe verbunden sind, machen frühzeitig auch die Etablierung von Leitlinien erforderlich, um eine Kostenexplosion in der Therapie der Patienten zu vermeiden.

Die prophylaktische Gabe von G-CSF vermindert die Dauer der Neutropenie sowie deren Schweregrad und kann lebensbedrohliche Komplikationen vermeiden [40]. Am ehesten sollte das G-CSF prophylaktisch verabreicht werden, wenn ein hohes Risiko der febrilen Neutropenie besteht oder wenn andere Komplikationen durch die Neutropenie die Behandlung beeinflussen könnten (Abb.4). Sie wird zudem als wichtig erachtet, wenn eine Reihe individueller Risikofaktoren wie zum Beispiel Alter > 65 Jahre oder ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium vorliegt, die eine schnelle und kritische Verschlechterung der Knochenmarkreserven erwarten lassen [34].

Standardmäßig werden G-CSF-Präparate zur Sekundärprophylaxe eingesetzt, wenn nach den ersten Therapiezyklen eine febrile Neutropenie (FN) auftritt [34], [35].



**Abbildung 4. Febrile Neutropenie: Risikobeurteilung und Therapieempfehlung (EORTC/ASCO).** Hier wird die prophylaktische Vergabe von G-CSF Anhang des Risikos für febrile Neutropenie (FN) gezeigt. Bei FN Risiko über 20% ist eine Prophylaxe mit G-CSF empfohlen, bei weniger als 10 % nicht empfohlen. Bei der Patientengruppe mit FN Risiko 10 – 20 % muss individuell Anhang des Patientenzustandes entschieden werden [41].

Klinische Studien und ökonomische Modellrechnungen zeigen, dass eine G-CSF-Prophylaxe in Betracht kommt, wenn das entsprechende Risiko für FN 20 % oder mehr beträgt. Wenn dann G-CSF prophylaktisch verwendet wird, reduziert dies das Risiko um 50 %. Bei bereits eingetretener Neutropenie gibt es weniger Daten zur Risikoreduktion durch G-CSF [41].

### 1.2.5. Nebenwirkungen einer G-CSF- Therapie

Die häufigsten Nebenwirkungen einer G-CSF Therapie sind Knochen- und Muskelschmerzen sowie diverse unspezifische Symptome wie Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Appetitlosigkeit, Schleimhautentzündungen, Haarausfall und Laborveränderungen [20].

Seltene Nebenwirkungen umfassen Infiltrate der Lunge mit Husten, Fieber und Atemnot bis hin zum Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS), Vergrößerung der Milz bis hin zur Milzruptur, sowie Leukozytose [20], [42].

Eine amerikanische Studie warnt darüber hinaus vor der Anwendung bei Patienten mit Sichelzellanämie, da hier schwere Nebenwirkungen bis hin zum Multiorganversagen häufiger beobachtet wurden [20], [43].

Das US National Marrow Donor Programm untersucht die amerikanischen Knochenmarkspender, die mit Filgrastim behandelt wurden, jährlich nach. Hierbei wurde in einer Kohorte von 4015 Spendern, deren G-CSF-Behandlung zwischen einem und neun Jahren zurück lag, bisher keine erhöhte Inzidenz von Krebserkrankungen festgestellt. Leukämiefälle wurden in dieser Kohorte keine gefunden [20], [44].

Im August 2013 wies die Firma Amgen (Hersteller der Präparate Neupogen® und Neulasta®) in einem Rote-Hand-Brief darauf hin, dass die Behandlung mit Filgrastim/Pegfilgrastim mit dem Risiko von Kapillarlecksyndrom (capillary leak syndrome, CLS) bei Krebspatienten und gesunden Spendern verbunden ist [20], [45].

## **2. ZIELSETZUNGEN**

Das Ziel des Forschungsvorhabens ist, nachzuprüfen, ob der Spiegel von G-CSF einen Rückschluss auf die Krankheitsursache bei unklarer Neutropenie zulassen. Insbesondere soll untersucht werden, ob man anhand der Spiegelbestimmung eine Bildungsstörung (hämatopoetische Insuffizienz) von einer AIN unterscheiden kann.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

Das Vorhaben war bei der Ethikkommission eingereicht und genehmigt (Eintrag und Bestätigung im UKR am 9/7/2015).

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Patienten- und Kontrollproben (Serum)

116 Patientenproben (Serum) von 59 Patienten mit Zeichen einer Neutropenie im Blutbild wurden speziell für die Studie von Februar 2010 bis August 2017 asserviert. Die Patienten stammen aus dem Bereich der Pädiatrischen Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation (PHOS) der Universitätsklinikum Regensburg (UKR) und sind zum Zeitpunkt der Probenentnahme im Alter von 1 Monat bis 18 Jahren. Es wurden mehrere Proben von einem Patienten im unterschiedlichen Zeitraum bekommen und ausgewertet. Dies hat uns erlaubt anhand der Spiegelbestimmung den klinischen Verlauf der Patienten zu folgen. Alle Patientenproben wurden blind bearbeitet.

Als Kontrollproben wurden Serum gesunder Personen mit einem normalen Blutbild und Patienten in Nachsorge verwendet. Es wurden 42 Serumproben von Personen im Alter von 2 Monaten bis 65 Jahren gewonnen. Alle Proben wurden blind bearbeitet.

##### 3.1.2. Geräte und Laborbedarf

BEZEICHNUNG	HERSTELLER
Aluminiumfolie 30 µ-Qualität 500 mm breit, 100 m Lang	Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire
Biosphere Filter Tips 1250 ml extra long	SARSTEDT, Nümbrecht
Computer DELL Optiplex 780 SFF	DELL, Texas
Drucker HP LaserJetP2015dn	HP, Kalifornien
Einweghandschuhe Neo Touch 6,5-7 S Neoprene	Ansell, Richmond
Electronic Multipette Stream	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorfgefäße	Eppendorf AG, Hamburg

Händedesinfektion Multisept	Otopront GmbH, Hohenstein
Notebook HP Protect Smart Intel Core i3.	HP, Kalifornien
Pipetten biopur certified purity grade 5 ml / 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten Research pro 50-1200 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten PIPETMAN® 2-20 ml / 20-200 ml / 100-1000 ml	Gilson International B.V., Bad Camberg
Pipetten 2- 20 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenständer	Gilson International B.V., Bad Camberg
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Photometer MRX II	Dynex Technologies GmbH, Denkendorf
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Schüttelgerät Heidolph Titramax 1000	Heidolph Instruments, Schwabach
Schüttelgerät VORTEX-GENIE 2	Scientific Industries, New York
Securline LAB MARKER	Aspen Surgical, Michigan
Serological Pipette 5/10/25/50 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
StarTub Reagent Reservoir 55 ml	STAR LAB GROUP, Hamburg
Ständer	MILLIPORE, Massachusetts
Ständer	BIOCHROM GmbH, Berlin
Timer	TFA-Dostmann GmbH & Co, Reicholzheim
Tip System Box	SARSTEDT, Nümbrecht
TUB 14 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
TUB 50 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Waschlotion Manisoft	Ecolab Inc., Minnesota
Zentrifuge Combi-Spin FVL-2400N	BioSan, Lettland



### 3.1.3. Reagenzien

Für die Durchführung des ELISA-Tests zur G-CSF-Spiegelbestimmung wurden Quantikine G-CSF HS ELISA der R&D Systems benutzt. Jeder Satz beinhaltet folgende Reagenzien:

G-CSF HS Mikroplatte	96 Well-Polystyrol-Mikrotiterplatte, beschichtet mit monoklonalen Antikörpern gegen G-CSF (12 Streifen mit 8 Reihen).
G-CSF HS Standard	3000 pg recombinantes G-CSF in gepufferter Proteinbasis mit Konservierungsstoffen, lyophilisiert.
G-CSF HS Conjugate	21 ml polyklonaler Antikörper gegen G-CSF konjugiert an Meerrettichperoxidase mit Konservierungsstoffen.
Assay Diluent RD1-60	11 ml gepufferter Proteinbase mit Konservierungsstoffen.
Calibrator Diluent RD6P	21 ml gepuffertes Tieren Serum mit Konservierungsstoffen. Verdünnend im Verhältnis 1:2 benutzen.
Waschpufferkonzentrat	21 ml einer 25-fach konzentrierten Lösung von gepufferten Surfactanten mit Konservierungsstoffen.
Color Reagent A	12 ml Wasserstoffperoxid.
Color Reagent B	12 ml stabilisiertes Chromogen (tetramethylbenzidine).
Stop Solution	6 ml von 2 N Schwefelsäure.
Klebefolien	

Alle Reagenzien müssen bei 4°C gelagert sein. Unmittelbar vor dem Gebrauch sollen diese eine Raumtemperatur haben.

### 3.1.4. Software

<b>SOFTWARE</b>	<b>HERSTELLER</b>
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Kalifornien
Revelation™ 4.21	Novell, Utah
Office 365	Microsoft Corporation, Waschington
Office 2017 Home and Business	Microsoft Corporation, Waschington
Windows 7 Professional	Microsoft Corporation, Waschington
Windows 10 Professional	Microsoft Corporation, Waschington
Mozilla Firefox	Mozilla Corporation, Kalifornien
Microsoft Paint	Microsoft Corporation, Waschington
Adobe PDF	Adobe Systems, Kalifornien
Microsoft PowerPoint	Microsoft Corporation, Waschington
EndNote X8.2	Clarivate Analytics, Kanada
AMBOSS Wissen für Mediziner	MIAMED GmbH, Köln, Deutschland

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Patientenprobengewinnung

Die Gewinnung der Serumproben im Rahmen des Forschungsprojekts „G-CSF SPIEGEL BEI KINDERN ALS INSTRUMENT ZUR UNTERSCHIEDUNG EINER AUTOIMMUNNEUTROPENIE UND NEUTROPENIE BENIGNER GENESE VON EINER HÄMATOPOETISCHER INSUFFIZIENZ“ (intern als G-CSF-Studie genannt) lief im Zeitraum zwischen Februar 2010 bis August 2017. Die Studien-Patienten wurden sorgfältig aus den zahlreichen Patienten der Abteilung für PHOS aussortiert. Das waren Patienten, die zum Zeitpunkt der Vorstellung Zeichen einer Neutropenie aufgewiesen haben. Das waren Patienten mit den Diagnosen: AIN, Absolute Neutropenie, Neutropenie unklarer Genese, MDS, Myeloproliferative Neoplasien (MPN), Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS), Schwere Aplastische Anämie (SAA), Anorexia nervosa, Immunthrombozytopenie (ITP), Panzytopenie und andere. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Probenentnahme im Alter von 1 Monat bis 18 Jahren. Insgesamt wurden 116 Serumproben von 59 Patienten gewonnen. Bei 23 Patienten können wir den Verlauf der Werte dank mehrerer Serumproben, die in Zeitabstand gewonnen waren, beobachten.

Die Genehmigung der Ethikkommission für unsere Prozedere haben wir am 9. Juli 2015 bekommen. Damit die Proben von unserer Seite asserviert und bearbeitet werden konnten, brauchten wir eine von den Patienten/ deren Eltern/ Erziehungsberechtigten Personen unterschriebene Einwilligungserklärung für die Durchführung der Prozedere (Anhang 1, 2).

Die Aufklärung wurde durch einen Arzt der G-CSF-Studie im PHOS gründlich durchgeführt. Dem Patienten wurde eine Patienteninformation, die das Forschungsvorhaben breit und ausführlich darstellte, ausgehändigt (Anhang 3, 4). Dazu hat jeder eine Kopie seiner unterschriebenen Einwilligungserklärung mit der Unterschrift des aufklärenden Arztes mitbekommen.

### **3.2.2. Kontrollprobengewinnung**

Damit wir unsere Ergebnisse der G-CSF Messung richtig auswerten und weiter bearbeiten können brauchten wir gewisse Referenzwerte des G-CSF Spiegels, anhand dessen wir uns orientieren konnten. Da wir in der Literatur keine Referenzwerte finden konnten, mussten wir diese selber bestimmen.

Als Kontrolle wurden gesunde Personen mit einem normalen Blutbild und Patienten in Nachsorge verwendet. Es wurden 42 Serumproben von Personen im Alter von 2 Monaten bis 65 Jahren gewonnen.

Die Kontrollpersonen mussten auch eine Einwilligungserklärung für die Durchführung der Prozedere unterschreiben (Anhang 5, 6).

Wie auch im Falle der Patientenproben wurde die Aufklärung durch einen Arzt der G-CSF-Studie im PHOS gründlich durchgeführt. Der Person wurde eine Patienteninformation, die das Forschungsvorhaben breit und ausführlich darstellte, ausgehändigt (Anhang 7, 8). Dazu hat jeder eine Kopie seiner unterschriebenen Einwilligungserklärung mit der Unterschrift des aufklärenden Arztes mitbekommen.

### **3.2.3. Asservierung der Proben**

Voraussetzungen für die Gewinnung der Serumproben:

1. Die Menge von EDTA-Blut muss ausreichend sein.
2. Das EDTA-Blut muss am selben Tag asserviert werden.
3. Ausgefüllte Anforderung an das Labor (Anhang 9).
4. Vorhandensein einer Patienteneinwilligung.

Eine Anforderung an das Diagnostiklabor stellt ein Arzt aus der G-CSF-Studie aus. Da werden Patientendaten, klinische Angaben/Verdachtsdiagnose, bisherige Therapie/Therapiestudie und die angeforderte Diagnostik angegeben (Anhang 9). Es werden nur die Proben bzw. Restmaterial zu Verfügung gestellt. Damit wird das Restblut nach medizinisch notwendig gewesenen Blutentnahmen gemeint. Für die Analyse von G-CSF wird EDTA-Plasma benötigt, dazu ist eine Blutentnahme von mindestens 2 ml EDTA-Vollblut erforderlich. Aus dem EDTA-Vollblut wird Plasma gewonnen. Nach dem Zentrifugieren 4000 Umdrehungen pro Minute (U / min) 5 min wird aus dem Überstand Plasma bzw. Serum gewonnen. Der Überstand wird in ein unbeschichtetes Probenröhrchen (Kryovial) pipettiert und bei -20 °C gelagert.

### **3.2.4. ELISA-Test**

#### **3.2.4.1. Definition**

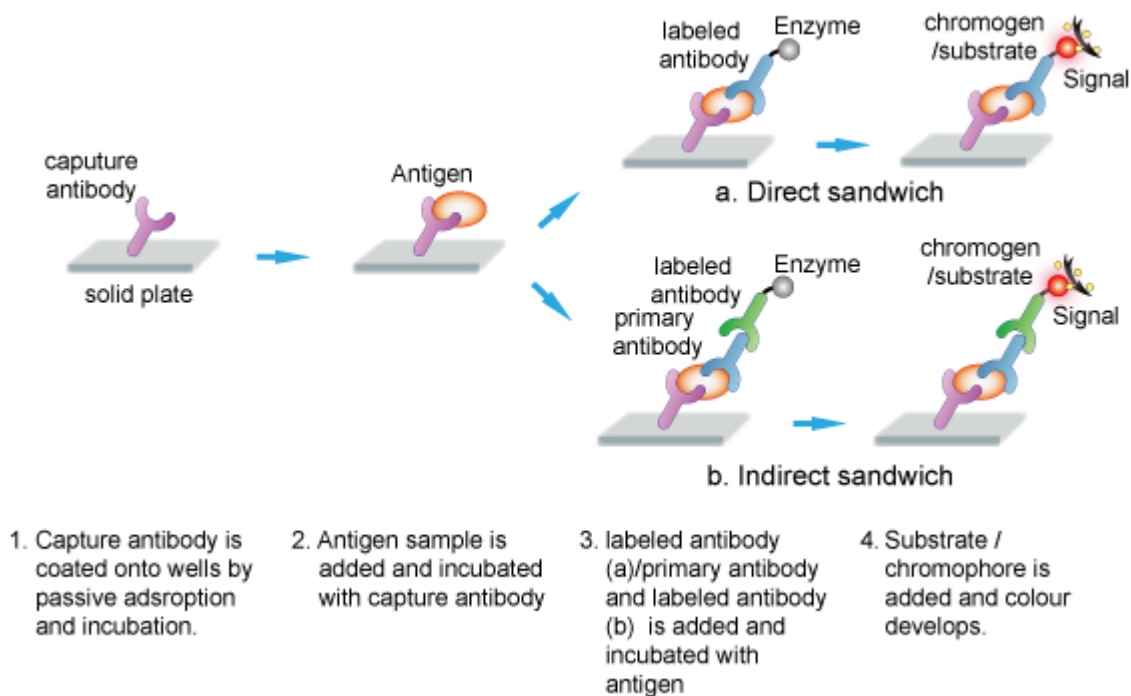
Für die Auswertung des G-CSFs (pg/ml) wurde ELISA-Test (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) als Methode benutzt.

ELISA kann mit Hilfe einer enzymvermittelten Reaktion Antigen- oder Antikörperkonzentration messen. Mit ELISA lassen sich Proteine, Hormone, Antikörper, Tumormarker, Viren und Pharmaka im Serum feststellen.

Das Signal bei der ELISA-Methode ist quantifizierbar. Man braucht zumindest einen Antikörper, um ein spezifisches Antigen zu detektieren oder das Vorhandensein noch eines Antikörpers. Die Probe mit einer unbekanntem Menge Antigen wird auf der Mikrotiterplatte immobilisiert. Danach wird der Antikörper zur Detektion zugegeben. Das führt zur Entstehung eines Antigen-Antikörper-Komplexes. Dieser Antikörper ist mit einem Enzym konjugiert und erlaubt, in dem letzten Arbeitsschritt, die Umsetzung eines Substrats in ein detektierbares Signal. Die Enzyme stellen eine Farbreaktion da, die schließlich gemessen wird.

Für unsere Auswertung wurde Sandwich ELISA verwendet (Abb.5).

## Sandwich ELISA



**Abbildung 5. Schematische Darstellung der Sandwich ELISA.** 1. Die Empfangs-Antikörper sind durch passive Adsorption auf die Well aufgetragen und inkubiert. 2. Antigenprobe wird zugegeben und mit Empfangs-Antikörpers inkubiert. 3. Markierte Antikörper (a) Primärantikörper und markierte Antikörper (b) wurden dazugegeben und mit Antigen inkubiert. 4. Substrat/Chromophor wird hinzugefügt und die Farbe entwickelt sich [46].

ELISA kann das Vorhandensein eines Antigens detektieren (direkte Methode) oder an einen anderen Antikörper binden, der ein Antigen erkennt (indirekte Methode); die neuste und effektivste Methode heutzutage ist das Sandwich ELISA. Die Sandwichmethode misst die Menge des Antigens zwischen zwei Lagen von Antikörpern. Sandwichmethoden haben die Einschränkung, dass das Antigen mindestens zwei Antigenbindungsstellen besitzen muss, damit mindestens zwei verschiedene Antikörper binden können. Nützlich sind die ELISA Sandwichmethoden, besonders wenn die Konzentration des Antigens gering ist oder eine hohe Konzentration anderer Antigene eine Probe verschmutzt. Erst wird ein sogenannter „Fangantikörper“ an einen Untergrund gebunden. Das Antigen wird hinzugefügt und bindet an diesen Fangantikörper. Ein zweiter primärer unmarkierter Detektionsantikörper wird hinzugefügt, um das Sandwich zu vervollständigen. Das Ergebnis kann quantifiziert werden, indem ein markierter sekundärer Antikörper hinzugefügt wird, der an den zweiten primären Antikörper bindet und die enzymatische Farbreaktion katalysiert. Der Vorteil dieser Methode ist, dass das

Antigen dank hoher Spezifität nicht gereinigt werden muss, der Nachteil - man kann nicht für alle Antikörper diese Methode verwenden.

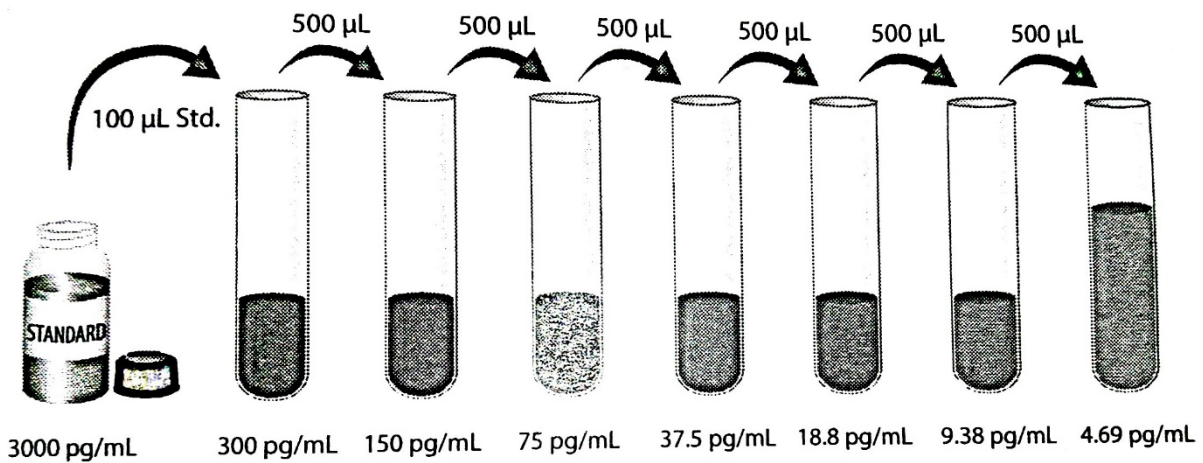
### **3.2.4.2. ELISA-Vorgang im Labor**

Pro 96 Well-Polystyrol-Mikrotiterplatte konnte man 24 Patientenproben bearbeiten. Die Mikrotiterplatte, beschichtet mit monoklonalen Antikörpern gegen G-CSF, hat 12 Streifen mit 8 Reihen. Die ersten zwei Reihen wurden für Standards und Blank benutzt, die restlichen Reihen für 24 Patientenproben in Triplikate.

Für den ELISA-Vorgang müssen Vorbereitungen stattfinden:

1. Waschpuffer herstellen: zu 20 ml Waschpufferkonzentrat 480 ml Vollentkalktes-Wasser zugeben und gut mischen.
2. Substrate Solution: erst 15 Minuten (min) vor Gebrauch ansetzen: Color Reagent A + Color Reagent B im Verhältnis 50:50 gut miteinander mischen. Man braucht 200ml pro Well. Vor Licht schützen.
3. Calibrator Diluent PD6P: 10 ml RD6P zu 10 ml vollentkalktem Wasser geben um 20 ml Calibrator Diluent RD6P zu bekommen (RD6P 1:2).
4. G-CSF HS Standard: Das Standard Vial ab zentrifugieren, in 1 ml vollentkalktem Wasser lösen, mit der Endkonzentration von 3000 pg / ml. Die hergestellte Lösung 15 min stehen lassen, dazwischen immer wieder mal schütteln.

Für die Standard Verdünnungsreihe wurden 8 Stück je 1,5 ml Eppendorfer Reaktionsgläser (Eppis) beschriftet, jeweils eine mit 300 pg / ml, 150 pg / ml, 75 pg / ml, 37,5 pg / ml, 18,8 pg / ml, 9,38 pg / ml, 4,69 pg / ml und Blank, was in der Folge mit den Lösungskonzentrationen übereinstimmen wird. Ins erste Eppi (300 pg / ml) 900 ml RD6P 1:2 hingeben und dazu 100 ml Standard (3000 pg / ml), in 7 andere Eppis jeweils 500 ml RD6P Verdünnung 1 zu 2. Die Lösung im ersten Eppi wird zum Herstellen von Verdünnungsreihe mit 500 ml Lösung wie abgebildet benutzt (Abb.6).



**Abbildung 6. Herstellung von G-CSF HS Standard Verdünnungsreihe. Quantikine HS ELISA.** Standard 3000 pg/mL. Die Verdünnungsreihe fängt mit der Konzentration 300 pg/mL an und endet mit 4,69 pg/mL. Blank (Calibrator Diluent RD6P (1:2)) - 0 pg/mL, Quelle ELISA R&D Manuel user.

Vor jeder Überführung muss der Inhalt des jeweiligen Eppis gut gemischt werden. Das 300 mg / ml Standard muss der höchstkonzentrierte Standard sein, das herkömmliche Calibrator Diluent als Blank (0 pg / ml).

Assay Prozedere (Proben + Standard): Alle Reagenzien müssen Raumtemperatur haben. Vorgehensweise:

1. Auf die 96 Well-Polystyrol-Mikrotiterplatte wird jeweils 100 µl Assay Diluent RD1-60 in jedes Well zugegeben.
2. Danach 100 µl von der Standard/Kontrolle/Probe pro Well, die Platte mit der Klebefolie abdecken und 2 Stunden in Raumtemperatur auf dem horizontalen orbitalen mikroplatten Schüttler bei 500 rpm (engl. revolutions per minute) schütteln.
3. Nach 2 Stunden vom Schüttler nehmen, das Überschüssige verwerfen, 4-mal mit 290 µl Waschpuffer/Well waschen, die Platte durch klopfen und auf Papier trocknen.
4. In jedes Well 200 µl G-CSF HS Conjugate zugeben, die Platte mit neuer Klebefolie abdecken und auf 2 Stunden in Raumtemperatur auf dem horizontalen orbitalen mikroplatten Schüttler bei 500 rpm schütteln.
5. Nach 2 Stunden vom Schüttler nehmen, das Überschüssige verwerfen, 4-mal mit 290 µl Waschpuffer/Well waschen, die Platte durch klopfen auf Papier trocknen.
6. In jedes Well 200 µl Substrate Solution geben, vor Licht mit Alufolie schützen, Platte bei 30 Minuten in Raumtemperatur inkubieren.

7. Nach 30 Minuten in jedes Well 50 µl Stop Solution zugeben. Im Platte Reader (Photometer Dynex Technologies MRX II) innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm mit Wellenlängenkorrektur (540 oder 570 nm) messen.

### **3.2.5. Klinische und statistische Analyse**

Alle Daten wurden blind bearbeitet. Zuerst wurden die Akten von den zum Forschungsprojekt „G-CSF SPIEGEL BEI KINDERN ALS INSTRUMENT ZUR UNTERSCHIEDUNG EINER AUTOIMMUNNEUTROPENIE UND NEUTROPENIE BENIGNER GENESE VON EINER HÄMATOPOETISCHER INSUFFIZIENZ“ ausgewählten Patienten abgearbeitet. Als nächstes wurde das ELISA der kodierten Patientenproben im Labor durchgeführt. Letztendlich nach dem wir einerseits Patientendaten und andererseits kodierte G-CSF Spiegelbestimmung hatten, wurden die ganzen Daten entschlüsselt und diese weiter statistisch analysiert.

Die statistischen Analysen erfolgten mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 6 für Microsoft Windows. Die deskriptiven Daten wurden durch Mittelwert, Median und Standardabweichung dargestellt. Mit Hilfe der Microsoft Exceltabellen und Graphiken wurden die Ergebnisse dargestellt. Diese wurden mit solchen statistischen Tests wie statistische Signifikanz, P-Wert, One way ANOVA, T-Test überprüft und mit Spezifität und Sensitivität Analyse der ausgewählten Methode dargestellt.

#### **3.2.5.1. Gewinnung den klinischen Parametern**

Zuerst wurden die Akten von 59 Patienten bearbeitet. Folgende Information wurde aus deren Akten benötigt: Name, Geburtsdatum, Geschlecht (m/w), Proben Entnahmedatum, Alter (zum Zeitpunkt der Probenentnahme), Blutbild (gesamte Leukozytenzahl, Zahl der neutrophilen Granulozyten), C-reaktives Protein (CRP) (mg/l), Infektzeichen (bestand ein Infekt zum Zeitpunkt der Probenentnahme oder nicht), Haupt- und Nebendiagnose, Anmerkungen (z.B. klinisches Verlauf, G-CSF Gabe, wiederkehrende fieberhafte Infekte, SZT, etc.).

Um die Patientendaten einzuordnen wurde folgende Tabelle erstellt (Tab.5) und diesen Anhang des Patientennamens sortiert.



Name	Vorname	Geburtsdatum	Geschlecht (m/w)	Proben Entnahmedatum	Alter	Blutbild	CRP (mg/l) N<3	Infekt +/-	Diagnose	Nebendiagnose	Anmerkungen

**Tabelle 5. Daten aus den Patientenakten.**

Für die 42 Kontrollproben haben wir eine andere Tabelle (Tab. 6) erstellt, wo Name, Geburtsdatum, Geschlecht (m/w), Proben Entnahmedatum, Alter (zum Zeitpunkt der Probenentnahme), Blutbild (gesamte Leukozytenzahl, Zahl der neutrophilen Granulozyten), Diagnose/Anmerkungen (z.B. Nachsorgepatient etc.) angegeben ist.

Name	Vorname	Geburtsdatum	Geschlecht (m/w)	Proben Entnahmedatum	Alter	Blutbild	Diagnose/ Anmerkungen

**Tabelle 6. Daten der Kontrollpersonen.**

Das C-reaktives Protein (CRP) bei der Kontrollpersonengewinnung wurde anhand des Schnelltestes mit ja oder nein getestet. Nur klinisch gesunde und CRP negative Kontrollpersonen wurden für die Studie ausgewählt.

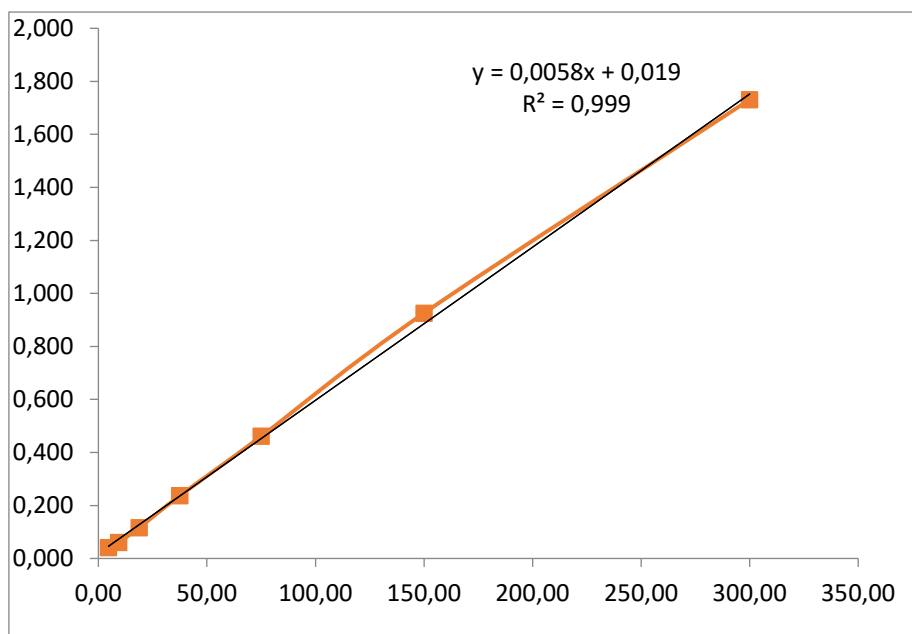
### **3.2.5.2. G-CSF-Spiegelbestimmung mittels ELISA**

Die Patienten und Kontrollproben (Serum) wurden blind bearbeitet. Diese wurden entsprechend kodiert: von 1 bis 116 und von K1 bis K42. Die Bearbeitung, Messung

und Auswertung der ELISA Mikrotitelplatten erfolgte über den Photometer Dynex Technologies MRX II mit dem Software Revelation™ 4.21.

Die Patienten Proben, deren Wert nach der Photometrie über die Standards hinausgegangen ist mussten rausgenommen sein und erneut bearbeitet werden, da sie nicht messbar waren. Diese Proben wurden verdünnt (1:2, 1:5 oder 1:10) und erneut ELISA gemacht.

Das Ergebnis würde im Excel Anhang der Standard-Kurve dargestellt (Abb.7).



**Abbildung 7. Beispiel einer Standard-Kurve. Lineare Regression mit Daten-Extrapolation.** X= Konzentration, y=OD.  $x=(OD+0,0039) / 0,0021$  ;  $R^2= 0,999$ .

Für die Eintragung des G-CSF-Spiegels der Patienten wurde folgende Tabelle erstellt (Tab.7).

Kodierung der Proben	G-CSF (pg/ml)
1	
(...)	
116	

**Tabelle 7. G-CSF - Spiegel der Patientenproben.**

Für die Eintragung des G-CSF Spiegels der Kontrollproben wurde eine ähnliche Tabelle (Tab.8) erstellt.

<i>Kodierung der Proben</i>	<i>G-CSF (pg/ml)</i>
K1	
(...)	
K42	

**Tabelle 8. G-CSF- Spiegel der Kontrollproben.**

Nachdem alle Patientendaten gesammelt und sortiert waren, wurden diese entschlüsselt. Aus den zwei Tabellen (Tab. 5 und Tab.7) wurde die Tabelle 9 erstellt. Diese wurde entsprechend ausgefüllt.

<i>Kodierung der Proben</i>	<i>Name</i>	<i>Vorname</i>	<i>Geburtsdatum</i>	<i>Geschlecht (m/w)</i>	<i>Proben Entnahmedatum</i>	<i>Alter</i>	<i>Blutbild</i>	<i>CRP (mg/l) N&lt;3</i>	<i>Infekt +/-</i>	<i>G-CSF</i>	<i>Diagnose</i>	<i>Nebendiagnose</i>	<i>Anmerkungen</i>
1													
(...)													
116													

**Tabelle 9. Patientendaten mit dem G-CSF Spiegel, entschlüsselt.**

Für die weitere Bearbeitung der Kontrollproben wurde aus den Tabellen 6 und 8 eine Tabelle 10 erstellt.

<i>Name</i>	<i>Vorname</i>	<i>Geburtsdatum</i>	<i>Geschlecht (m/w)</i>	<i>Proben Entnahmedatum</i>	<i>Alter</i>	<i>Blutbild</i>	<i>G-CSF</i>	<i>Diagnose/ Anmerkungen</i>


**Tabelle 10. Daten der Kontrollpersonen mit G-CSF Spiegel, entschlüsselt.**

Die ausgefüllten kodierten Versionen der Tabellen in gekürzter Form werden in den Ergebnissen dargestellt.

### **3.2.5.3. Gütekriterien der Messinstrumente (Objektivität, Reliabilität, Validität)**

Für das ELISA Verfahren haben wir die Quantikine G-CSF HS ELISA der R&D Systems benutzt. Es lagen keine Daten in der Literatur vor, voran wir uns basieren konnten und wir mussten erst die Testmethode auf Richtigkeit und Verlässlichkeit überprüfen. Ganz am Anfang wurden Test-Kits gemacht, damit wir den Vorgang im Labor richtig beginnen und standardisieren können, um Fehler zu vermeiden, besonders bezogen auf systemische Fehler. Dafür haben wir immer die Vorgehensweise aus dem ELISA Kit schriftlich vor Augen gehabt und das standardisierte Auswertungssoftware Revelation™ 4.21 benutzt. Damit haben wir die Unabhängigkeit des Verlaufs und der Ergebnisse (**Objektivität**) von dem Untersucher garantiert.

Die Zuverlässigkeit des Testverfahrens (**Reliabilität**) haben wir durch die blinde Messung der einzelnen Werte in Triplikate (Parraleltestreliabilität) getestet und den arithmetischen Mittelwert der Ergebnisse benutzt. Im Laufe der Bearbeitung der Kits wurden zwischendurch Wiederholungen zufallsmäßig ausgesuchter Proben durchgeführt und die Werte beider Messungen verglichen. Damit ist die Retest-Reliabilität gemeint. Eine hohe Retest-Reabilität liegt vor, wenn die Werte beider Messungen zu ähnlichen Ergebnissen führen. Man kann die Retest-Reliabilität als Korrelationskoeffizient  $r$  zwischen den beiden Messungen ausdrücken. Werte von  $r > 0,8$  sprechen für eine gute Reliabilität, was auch der Fall war [47].

Da die Ergebnisse sorgfältig gruppiert worden sind, standardisierte Messmethoden benutzt worden sind und schriftliche Vorgehensweisen vorlagen, hat das alles für die Aussagekräftigkeit der Ergebnisse gesorgt (**Validität**).

### 3.2.5.4. Statistische Tests

Mit unserer Hypothese wollten wir überprüfen, ob der Spiegel von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren einen Rückschluss auf die Krankheitsursache bei unklarer Neutropenie zulässt oder nicht. Besonderen Wert haben wir draufgelegt, um zu prüfen, ob man anhand der Spiegelbestimmung eine Bildungsstörung (hämatopoetische Insuffizienz) von einem immunologischen Geschehen unterscheiden kann. Folgende Fragen müssten beantwortet werden:

- Gibt es einen Unterschied zwischen den Gruppen?
- Sind die Unterschiede in diesen Gruppen relevant oder nicht?
- Stimmt der Unterschied unserer Hypothese zu oder ist es nur ein Zufall?

Um diese Fragen zu beantworten, benutzen wir die Hilfe der statistischen Tests. Eine von diesen ist die statistische Signifikanz. Die folgenden statistischen Definitionen und Erklärungen sind aus der Quelle [www.amboss.miamed.de](http://www.amboss.miamed.de) [47] und [de.wikipedia.org](http://de.wikipedia.org) [48] übernommen.

#### 3.2.5.4.1 Statistische Signifikanz und P-Wert

Signifikanz bezeichnet einen Unterschied zwischen zwei Ergebnissen, der zu extrem ist, um noch als zufällig gelten zu können. Sie ist ein Kriterium für die Aussagekraft eines Ergebnisses. Ob ein Ergebnis als signifikant gilt, hängt vom Signifikanzniveau ab, das für die entsprechende Studie gewählt wurde: Standard ist ein Signifikanzniveau von 5 % (0,05), was bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit besteht, dass ein positives Ergebnis durch Zufall zu Stande gekommen ist, d.h. unter 5 % (0,05).

Dazu berechnet man einen **p-Wert**, der eine Einschätzung erlaubt, wie wahrscheinlich ein rein zufälliges Ergebnis ist.

Der **p-Wert** ist das Ergebnis eines statistischen Tests. Dies erlaubt eine Einschätzung, wie sicher ein Unterschied in der Stichprobe auf einem „echten“ Unterschied in der Grundgesamtheit beruht bzw. ob dieser nur zufällig in der Stichprobe aufgetreten ist. Ein niedriger **p-Wert** spricht dabei für einen echten Unterschied, also für eine niedrige Wahrscheinlichkeit eines  **$\alpha$ -Fehlers**.

Beim Schluss von einer Stichprobe auf die Grundgesamtheit besteht immer eine gewisse Unsicherheit. Man unterscheidet den  **$\alpha$ -Fehler** vom  **$\beta$ -Fehler**.

- **$\alpha$ -Fehler**: Ungerechtfertigtes Annehmen der Alternativhypothese  $H_1$
- **$\beta$ -Fehler**: Ungerechtfertigtes Beibehalten der Nullhypothese  $H_0$

Signifikantes Ergebnis: **p-Wert** ist kleiner als das Signifikanzniveau.

Einfluss des Signifikanzniveaus:

- Positiver Aspekt: Je niedriger das Signifikanzniveau, desto unwahrscheinlicher ist ein  **$\alpha$ -Fehler**
- Negativer Aspekt: Je niedriger das Signifikanzniveau, desto unwahrscheinlicher ist ein signifikantes Ergebnis, desto aufwendiger die Studie und desto wahrscheinlicher ist ein  **$\beta$ -Fehler**

Ein nicht-signifikanter **p-Wert** bedeutet, dass man die Nullhypothese nicht ablehnen darf. Er beweist aber die Nullhypothese nicht, sondern kann auch durch eine zu kleine Fallzahl entstehen.

### 3.2.5.4.2 Varianzanalyse

Varianzanalyse (ANOVA von engl. analysis of variance) ist eine große Gruppe datenanalytischer und strukturprüfender statistischer Verfahren, die zahlreiche unterschiedliche Anwendungen zulassen. Ihnen gemeinsam ist, dass sie Varianzen und Prüfgrößen berechnen, um Aufschlüsse über die hinter den Daten steckenden Gesetzmäßigkeiten zu erlangen. Die Varianz einer oder mehrerer Zielvariablen wird dabei durch den Einfluss einer oder mehrerer Einflussvariablen (Faktoren) erklärt. Die einfachste Form der Varianzanalyse testet den Einfluss einer einzelnen nominalskalierten auf eine intervallskalierte Variable, indem sie die Mittelwerte der abhängigen Variablen innerhalb der durch die Kategorien der unabhängigen Variablen definierten Gruppen vergleicht. Somit stellt die Varianzanalyse in ihrer einfachsten Form eine Alternative zum T-Test dar, die für Vergleiche zwischen mehr als zwei Gruppen geeignet ist [48].

In unserem Fall haben wir die einfaktorielle ANOVA benutzt. Dabei untersucht man den Einfluss einer unabhängigen Variablen (Faktor) mit **k** verschiedenen Stufen (Gruppen) auf die Ausprägungen einer Zufallsvariable. Dazu werden die **k** Mittelwerte der Ausprägungen für die Gruppen miteinander verglichen, und zwar vergleicht man die Varianz zwischen den Gruppen mit der Varianz innerhalb der Gruppen. Weil sich die totale Varianz aus den zwei genannten Komponenten zusammensetzt, spricht man von Varianzanalyse. Die einfaktorielle ANOVA ist die Verallgemeinerung des t-Tests im Falle mehr als zwei Gruppen. Für **k=2** ist sie äquivalent mit dem T-Test [48].

#### **3.2.5.4.3 T-Test**

Der T-Test ist der Hypothesentest der T-Verteilung. Er kann verwendet werden, um zu bestimmen, ob zwei Stichproben sich statistisch signifikant unterscheiden. Meistens wird der T-Test (und auch die T-Verteilung) dort eingesetzt, wo die Testgröße normalverteilt wäre, wenn der Skalierungsparameter (der Parameter, der die Streuung definiert — bei einer normalverteilten Zufallsvariable die Standardabweichung) bekannt wäre. Ist der Skalierungsparameter unbekannt, wird er durch eine Schätzung aus dem Datensatz ersetzt [49].

Wir haben das Zweistichproben-T-Test (auch Doppelter T-Test; engl. two-sample T-test) benutzt. Dies prüft anhand der Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben, wie sich die Mittelwerte zweier Grundgesamtheiten zueinander verhalten. Dabei wird vorausgesetzt, dass die Daten der Stichproben einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammen. Der klassische T-Test setzt voraus, dass beide Stichproben aus Grundgesamtheiten mit gleicher Varianz entstammen. Der Welch-Test oder T-Test nach Satterthwaite ist eine Variante, die die Gleichheit der Varianzen nicht voraussetzt [48].

#### **3.2.5.4.4 Sensitivität und Spezifität der Analyse**

Die diagnostischen Tests sind i.d.R. nicht 100%ig zuverlässig, sodass Irrtumswahrscheinlichkeiten berücksichtigt werden müssen [47].

Wir haben ELISA als Methode zur Wahl genommen, um den Spiegel des G-CSFs im Blut (Serum) zu bestimmen. Im Zusammenhang mit den festgelegten Referenzwerten musste es festgestellt werden, ob die Person mit einer Neutropenie an einer Autoimmunneutropenie oder einer Knochenmarkbildungsstörung leidet. Später wird durch aufwändigere Untersuchungen festgestellt, ob die Person tatsächlich an dieser Krankheit leidet.

Die statistischen Definitionen wurden freundlicher Weise aus Quelle [de.wikipedia.org](http://de.wikipedia.org) [48] genommen und unten dargestellt.

Der Test stellt einen Klassifikator dar, der die Personen in die Kategorien „krank“ und „gesund“ einordnet. Als „gesund“ werden in unserem Fall Patienten mit AIN gemeint. Als „krank“ die Patienten mit einer Bildungsstörung im Knochenmark. Da es sich um eine Ja/Nein-Frage handelt, sagt man auch, der Test fällt *positiv* (Einordnung „krank“) oder *negativ* (Einordnung „gesund“) aus. Um zu beurteilen, wie gut geeignet der Labortest für die Diagnose der Krankheit ist, wird nun bei jedem Patienten

dessen tatsächlicher Gesundheitszustand mit dem Ergebnis des Tests verglichen. Dabei können vier mögliche Fälle auftreten:

1. **Richtig positiv:** Der Patient ist krank, und der Test hat dies richtig angezeigt.
2. **Falsch negativ:** Der Patient ist krank, aber der Test hat ihn fälschlicherweise als gesund eingestuft.
3. **Falsch positiv:** Der Patient ist gesund, aber der Test hat ihn fälschlicherweise als krank eingestuft.
4. **Richtig negativ:** Der Patient ist gesund, und der Test hat dies richtig angezeigt.

Im ersten und letzten Fall war die Diagnose also richtig, in den anderen beiden Fällen liegt ein Fehler vor. Die vier Fälle werden in verschiedenen Kontexten auch anders benannt. So sind auch die englischen Begriffe *true positive*, *false positive*, *false negative* und *true negative* gebräuchlich [48].

Diese Berechnungen kann man mit sog. „4-Felder-Tafeln“ darstellen (Tab.11).

	<b>Person ist krank</b>	<b>Person ist gesund</b>
<b>Test positiv</b>	Richtig positiv	Falsch positiv
<b>Test negativ</b>	Falsch negativ	Richtig negativ

**Tabelle 11. 4 - Felder Tafeln.** Als richtig wird hier ein Ergebnis des untersuchten Tests interpretiert, wenn es mit dem Goldstandard übereinstimmt.

**Sensitivität** (auch Richtig-positiv-Rate) gibt den Anteil der korrekt als positiv (krank) klassifizierten Objekten (Patienten) an der Gesamtheit der tatsächlich positiven Objekte (Patienten) an. Einfacher gesagt die Fähigkeit tatsächlich Kranke als krank zu erkennen.

Die Formel lautet:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl richtig positiver}}{(\text{Anzahl richtig positiver} + \text{Anzahl falsch negativer})}$$



Entsprechend gibt es die **Falsch-negativ-Rate** - den Anteil der fälschlich als negativ klassifizierten Objekte (Patienten) an der Gesamtheit der tatsächlich positiven Objekte (Patienten) an. Einfacher gesagt die Fähigkeit tatsächlich Kranke als gesund zu diagnostizieren.

Die Formel lautet:

$$\text{Falsch - negativ - Rate} = \frac{\text{Anzahl falsch negativer}}{(\text{Anzahl richtig positiver} + \text{Anzahl falsch negativer})}$$

Mit der **Spezifität** (auch Richtig-negativ-Rate) wird der Anteil der korrekt als negativ klassifizierten Objekte (Patienten) an der Gesamtheit der in Wirklichkeit negativen Objekte (Patienten) bestimmt. Einfacher gesagt die Spezifität bezeichnet die Fähigkeit tatsächlich Gesunde als gesund zu identifizieren.

Die Formel lautet:

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl richtig negativer}}{(\text{Anzahl richtig negativer} + \text{Anzahl falsch positiver})}$$

Entsprechend gibt die **Falsch-positiv-Rate** - den Anteil der fälschlich als positiv klassifizierten Objekte (Patienten) an, die in Wirklichkeit negativ sind. Das bedeutet, dass ein tatsächlich Gesunder zu Unrecht als krank diagnostiziert wird.

Die Formel lautet:

$$\text{Falsch - positiv - Rate} = \frac{\text{Anzahl falsch positiver}}{(\text{Anzahl richtig negativer} + \text{Anzahl falsch positiver})}$$

#### 3.2.5.4.5 Prädiktive Werte.

**Prädiktiver Wert** (Vorhersagewert) gibt die Wahrscheinlichkeit der krank/gesund getesteten in der Tat krank/gesund zu sein.

- **positiver prädiktiver Wert (PPW)** - gibt den Anteil der korrekt als positiv klassifizierten Ergebnisse an der Gesamtheit der als positiv klassifizierten Ergebnisse an. Das gibt uns an, wie viele Patienten, die positiv getestet worden sind tatsächlich eine Knochenmarkbildungsstörung haben.

Die Formel lautet:

$$PPW = \frac{\text{Anzahl richtig positiver}}{(\text{Anzahl richtig positiver} + \text{Anzahl falsch positiver})}$$

- **negativer prädiktiver Wert (NPW)** - gibt den Anteil der korrekt als negativ klassifizierten Ergebnisse von der Gesamtheit der als negativ klassifizierten Ergebnisse an. Das zeigt uns den Anteil der Personen mit negativem Testergebnis, die auch tatsächlich „gesund“ sind und somit eine AIN haben.

Die Formel lautet:

$$NPW = \frac{\text{Anzahl richtig negativer}}{(\text{Anzahl richtig negativer} + \text{Anzahl falsch negativer})}$$

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Kontrollprobenbearbeitung

Die Werte der 42 Kontrollproben nach dem ELISA wurden im Software GraphPad Prism 6 für Microsoft Windows bearbeiten (Tab.12).

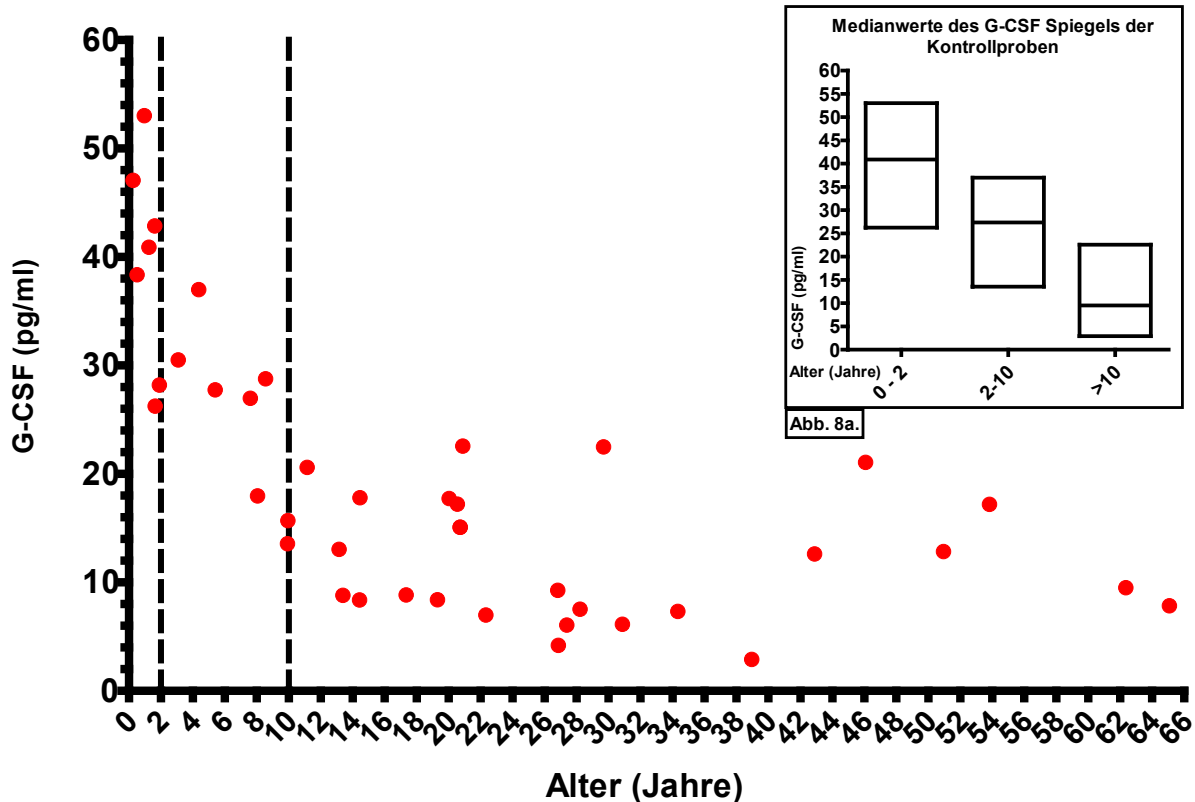
ID	Geschlecht (W/M)	Alter (Jahre)	Granulozyten ( $\mu$ l)	G-CSF (pg/ml)
K1	W	0,26	3000	47,06
K2	W	0,51	2400	38,36
K3	W	0,97	1860	53,03
K4	M	1,25	2900	40,90
K5	W	1,62	2600	42,86
K6	W	1,64	1763	26,24
K7	M	1,91	1700	28,19
K8	M	3,09	3400	30,50
K9	M	4,36	2431	36,99
K10	M	5,39	3300	27,76
K11	M	7,60	2000	26,97
K12	M	8,05	3000	17,98
K13	M	8,55	3000	28,76
K14	M	9,91	4100	13,56
K15	W	9,94	5100	15,69
K16	W	11,15	3200	20,60
K17	W	13,14	2900	13,05
K18	W	13,38	2500	8,80
K19	W	14,43	2528	8,38
K20	W	14,44	1680	17,80
K21	M	17,34	2900	8,85
K22	M	19,29	2900	8,39
K23	W	20,03	6400	17,73
K24	M	20,54	2000	17,21
K25	M	20,72	3100	15,09
K26	M	20,72	3100	15,09
K27	W	20,88	6700	22,56
K28	W	22,33	4400	6,99
K29	W	26,82	5700	9,27
K30	M	26,86	5700	4,20
K31	M	27,38	2600	6,07
K32	W	28,22	5400	7,53

K33	W	29,69	3300	22,50
K34	M	30,86	3500	6,15
K35	M	34,33	3100	7,33
K36	W	38,96	5000	2,90
K37	M	42,89	3200	12,62
K38	W	46,08	5100	21,06
K39	W	50,95	2400	12,84
K40	W	53,82	4400	17,19
K41	W	62,36	5000	9,50
K42	M	65,08	3200	7,84

**Tabelle 12. Kontrollproben, kodiert.** Darstellung von 42 kodierten Kontrollproben mit Angabe von Geschlecht, Alter zum Moment der Probenentnahme, Granulozytenwert ( $/\mu\text{l}$ ) und G-CSF Spiegel.

Die in der Tabelle 12 dargestellten G-CSF Werte der Kontrollproben liegen zwischen **2,9 pg/ml** und **53,0 pg/ml**. Es wurde eine Graphik erstellt, wo der G-CSF Wert altersabhängig von 0 bis 65 Jahre verteilt wurde (Abb.8).

## Altersabhängige G-CSF Spiegel der Kontrollproben



**Abbildung 8. Altersabhängige G-CSF Spiegel der Kontrollproben.** X-Achse- Alter in Jahren. Y-Achse – G-CSF Wert in pg/ml. In dieser Graphik sehen wir die Streuung der G-CSF Werte von 2,9 pg/ml bis 53,0 pg/ml altersabhängig von 0 bis 65 Jahren.

**Abbildung 8a. Medianwerte des G-CSF Spiegels der Kontrollproben.** X-Achse- Alter in Jahren. Y-Achse – G-CSF Wert in pg/ml. In dieser Graphik sind Medianwerte der Kontrollproben in 3 Gruppen gezeigt. Gruppe 1: Alter zwischen 0-2 Jahren, die G-CSF Werte liegen im Bereich 26,0-53,0 pg/ml. Gruppe 2: Alter zwischen 2-10 Jahre, die G-CSF Werte liegen im Bereich 14,0-37,0 pg/ml. Gruppe 3: Alter ab 10 Jahren bis Erwachsenen Alter, die G-CSF Werte liegen im Bereich 2,9-23,0 pg/ml.

Zu der linken Graphik wurde im Zusammenhang der einzelnen Werte die Kontrollproben altersabhängig gruppiert. Durch die Verteilung wurden 3 Gruppen erstellt:

- **Gruppe 1-** von 0 bis 2 Jahre **(0-2)**
- **Gruppe 2-** von 2 Jahre bis 10 Jahre **(2-10)**
- **Gruppe 3-** von 10 Jahre bis Erwachsenen Alter **(>10).**

In jeder Altersgruppe sieht man eine Streuung der Werte, die wir durch die Erstellung des Medianen der Werte dargestellt haben (Abb.8a).

Die statistische Analyse dieser drei Gruppen ist in der Tabelle 13 dargestellt.

Column statistics	Group 1 (0-2 years)	Group 2 (2-10 years)	Group 3 (>10 years)
Number of values	7	8	27
Minimum	26,24	13,56	2,904
25% Percentile	28,19	16,26	7,530
<b>Median</b>	40,90	27,36	9,503
75% Percentile	47,06	30,07	17,21
Maximum	53,03	36,99	22,56
<b>Mean</b>	39,52	24,78	12,13
Std. Deviation	9,647	8,160	5,807
Std. Error	3,646	2,885	1,118
Lower 95% CI of mean	30,60	17,95	9,834
Upper 95% CI of mean	48,44	31,60	14,43
Sum	276,6	198,2	327,5

**Tabelle 13. Statistische Analyse der Kontrollgruppen.** In dieser Tabelle ist die statistische Analyse der 3 Kontrollgruppen dargestellt. Pro Gruppe sind Zahl der Proben, Median und Mean, maximale und minimale Werte und Perzentilen dargestellt.

In der Gruppe 1 (0-2) sind 7 Kontrollproben dargestellt, deren G-CSF Wert im Bereich **26,0 - 53,0 pg/ml** liegt, Median bei 40,90 pg/ml und Mean bei 39,52 pg/ml  $\pm$  3,646 pg/ml ist.

In der Gruppe 2 (2-10) – 8 Kontrollproben im Bereich **14,0 - 37,0 pg/ml**, Median von 27,36 pg/ml und Mean von 24,78 pg/ml  $\pm$  2,885 pg/ml.

In der Gruppe 3 (>10) sind 27 Kontrollproben im Bereich **2,9 - 23,0 pg/ml**, Median von 9,5 pg/ml und Mean von 12,13 pg/ml  $\pm$  1,118 pg/ml.

Mit Hilfe des T-Tests haben wir überprüft, ob der Unterschied zwischen den Gruppen groß genug ist, um zu behaupten, dass die Gruppen verschieden sind (Tabelle 14).

Table analysis	Median values of the control groups	Table analysis	Median values of the control groups	Table analysis	Median values of the control groups
Group 1	0 - 2	Group 2	2-10	Group 1	0 - 2
Vs	vs	vs	vs	Vs	vs
Group 2	2-10	Group 3	>10	Group 3	>10
<b>Unpaired T test</b>		<b>Unpaired T test</b>		<b>Unpaired T test</b>	
P value	0,0068	P value	P<0.0001	P value	P<0.0001
P value summary	**	P value summary	***	P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.209 df=13	t, df	t=4.925 df=33	t, df	t=9.643 df=32
<b>How big is the difference?</b>		<b>How big is the difference?</b>		<b>How big is the difference?</b>	
Mean ± SEM of Group 1	39.52 ± 3.646 N=7	Mean ± SEM of Group 2	24.78 ± 2.885 N=8	Mean ± SEM of Group 1	39.52 ± 3.646 N=7
Mean ± SEM of Group 2	24.78 ± 2.885 N=8	Mean ± SEM of Group 3	12.13 ± 1.118 N=27	Mean ± SEM of Group 3	12.13 ± 1.118 N=27
Difference between means	14.74 ± 4.594	Difference between means	12.65 ± 2.568	Difference between means	27.39 ± 2.840
95% confidence interval	4.821 to 24.67	95% confidence interval	7.418 to 17.87	95% confidence interval	21.60 to 33.18
R squared	0,4420	R squared	0,4236	R squared	0,7440

**Tabelle 14. T-Test Auswertung der Medianwerte des G-CSF Spiegels der Kontrollproben.**

Der Unterschied zwischen der Gruppe 1 (0-2) und Gruppe 2 (2-10) ist bei  $p < 0,0068$  \*\* und somit statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

Der Unterschied zwischen der Gruppe 2 (2-10) und Gruppe 3 (>10) ist bei  $p < 0,0001$  \*\*\* und somit statistisch hoch signifikant ( $p < 0,05$ ).

Der Unterschied zwischen der Gruppe 1 (0-2) und der Gruppe 3 (<10) ist bei  $p < 0,0001$  \*\*\* und somit statistisch hoch signifikant ( $p < 0,05$ ).

Somit ist die G-CSF Verteilung der Kontrollgruppen zwischeneinander hoch Signifikant (ANOVA one way Test)  $p < 0,0001$  \*\*\*.

Nach der Prüfung der Daten wurden die Normwerte (Referenzwerte) für jede Altersgruppe intern bestimmt. Im Alter von 0 bis 2 Jahren liegt der G-CSF Wert im Referenzbereich **26,0 - 53,0 pg/ml**, im Alter von 2 bis 10 Jahren **14,0 - 37,0 pg/ml**, ab 10 Jahren **2,9 - 23,0 pg/ml** (Tab.15).

<b>Altersabhängige G-CSF Referenzwerte</b>	
<b>Alter (Jahre)</b>	<b>G-CSF Referenzbereich (pg/ml)</b>
0-2	26,0 - 53,0 pg/ml
2-10	14,0 - 37,0 pg/ml
>10	2,9 - 23,0 pg/ml

**Tabelle 15. Altersabhängige G-CSF Referenzwerte der G-CSF- Studie.**

## **4.2. Patientenprobenbearbeitung**

### **4.2.1. Klinische Parameter**

Im weiteren Verlauf wurde die Tabelle 9 den Anforderungen angepasst und eine neue Tabelle mit verschlüsselten Patientendaten verfasst. Damit wir die Daten richtig analysieren können und keine Verfälschung wegen des klinischen Verlaufs der Patienten auftritt, haben wir die Laborparameter aller 59 Patienten bei der Erstvorstellung in der Abteilung für PHOS benutzt. Diese sind in der Tabelle 16 dargestellt. Die neu verfasste Tabelle beinhaltet kodierte Patientennamen, Geschlecht (m/w), Alter (in Jahren bis zum Moment der Probenentnahme), Granulozytenzahl ( $\mu$ ) und G-CSF Spiegel (pg/ml). Von manchen Patienten haben wir mehrere Proben in zeitlichem Abstand gewonnen. Insgesamt waren es 116 Patientenproben. Dies hat uns ermöglicht diese Patientenfälle im Verlauf zu beobachten, was insgesamt 23 Fälle ergab.



ID	Geschlecht (W/M)	Alter (Jahre)	Granulozyten (/μ)	G-CSF (pg/ml)
1	W	0,39	1269	244,41
2	M	16,44	105	71,95
3	W	3,78	216	57,57
4	M	10,02	1500	5,03
5	M	9,11	1450	13,00
6	M	16,00	3304	21,21
7	M	10,6	4800	52,27
8	M	3,80	336	23,33
9	W	1,42	285	222,34
10	M	2,40	641	632,70
11	W	8,73	3600	111,55
12	W	4,55	400	412,30
13	M	10,76	4900	46,81
14	W	17,14	27	1.248,62
15	M	8,78	5400	54,60
16	M	12,40	27	493,94
17	M	13,92	3100	5,82
18	W	5,95	132	62,28
19	W	1,00	105	43,86
20	M	2,62	1734	321,50
21	W	0,97	240	115,51
22	W	13,02	1465	54,71
23	W	1,16	600	40,00
24	M	0,94	305	208,37
25	M	1,37	282	51,25
26	W	0,72	1326	161,86
27	W	1,70	21	211,60
28	M	0,29	700	64,22
29	M	0,27	1600	176,67
30	W	6,79	939	268,72
31	M	1,34	2400	82,16
32	W	12,36	2000	4,29
33	M	0,49	4000	12,08
34	M	1,19	31	32,84
35	M	0,82	558	89,58
36	W	18,16	400	323,24
37	M	13,03	896	87,25
38	W	16,24	1904	48,44
39	M	3,40	372	141,25
40	M	13,48	391	65,33
41	M	0,12	740	22,97
42	W	1,68	96	142,74
43	W	2,95	2100	33,74
44	M	1,92	860	70,52

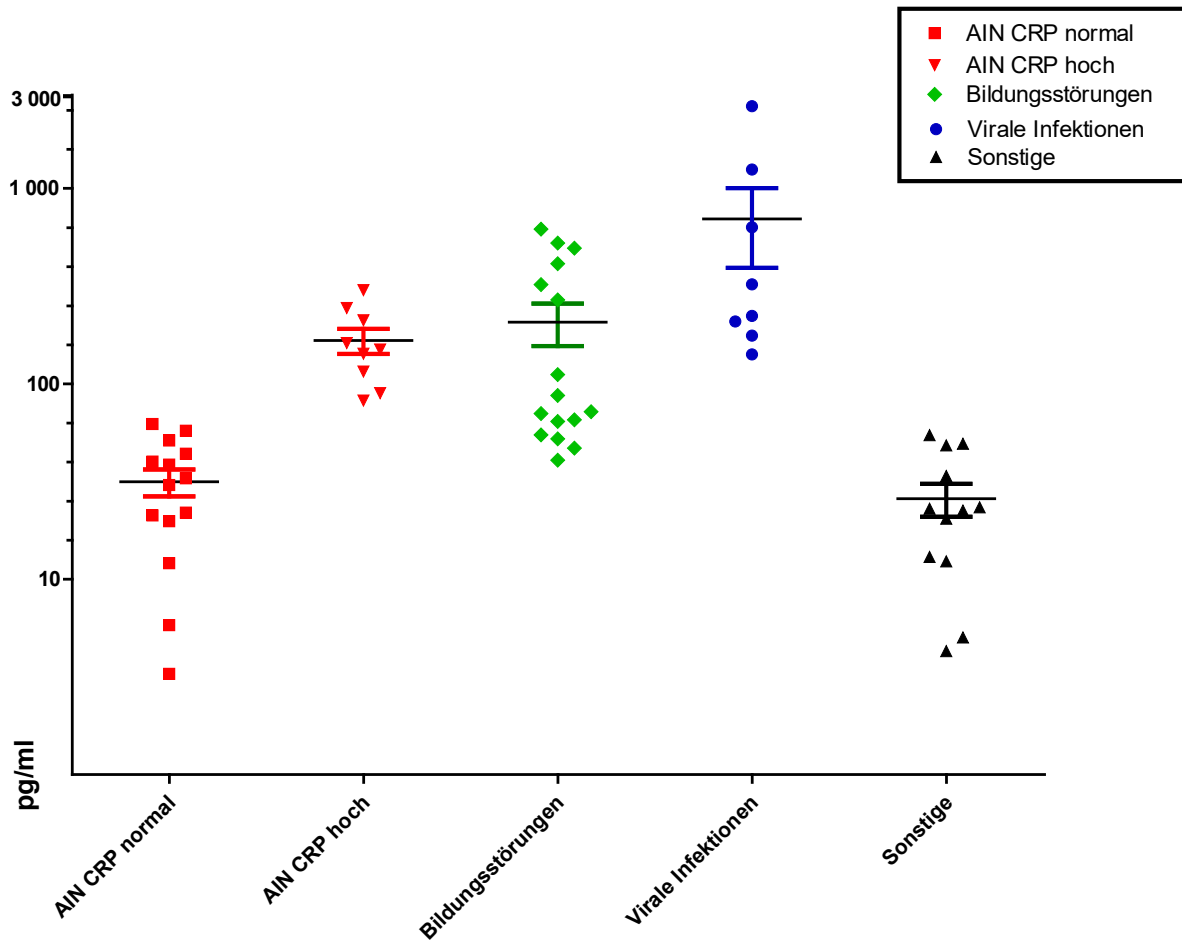
45	W	0,18	334	22,47
46	W	16,51	152	40,64
47	W	0,72	131	618,62
48	W	8,44	100	525,00
49	M	1,10	57	30,33
50	M	1,02	832	301,43
51	M	0,48	215	21,90
52	W	1,41	380	149,83
53	W	3,38	3400	38,64
54	W	1,06	9600	49,41
55	M	0,11	2300	2.634,83
56	M	13,89	1018	20,42
57	M	1,37	161	19,82
58	M	1,41	400	12,36
59	M	14,54	4890	3,28

**Tabelle 16. Patientenproben, kodiert.** Darstellung von 59 kodierten Patientenproben mit Angabe von Geschlecht, Alter zum Moment der Probenentnahme, Granulozytenwert ( $/\mu$ l) und G-CSF Spiegel.

#### 4.2.2. Patientengruppierung

Basierend auf die Patientendaten wurden die Patientenproben im Software GraphPad Prism 6 gruppiert. Die Gruppen wurden im Zusammenhang der Diagnose, der Klinik und des Verlaufs erstellt (Abb.9).

## G-CSF VERTEILUNG



**Abbildung 9. G-CSF- Verteilung der Patientenproben.** Die Graphik zeigt die gruppierte Verteilung der G-CSF-Werte. X-Achse- Gruppenverzeichnis. Y-Achse- G-CSF-Wert in pg/ml. ■ – AIN CRP normal, ▼ - AIN CRP hoch, ◆- Bildungsstörungen, ● - Virale Infektionen,▲ - Sonstige.

Pro Patienten ist ein Punkt hinterlegt, der uns den Wert des G-CSFs bei der Erstvorstellung bei PHOS zeigt, was insgesamt 59 Patientenproben (Punkte) ausmacht. Die G-CSF-Werte liegen zwischen 3,2 - 2635,0 pg/ml (Abb.9, Tab.16).

Die statistische Analyse dieser Gruppen ist in der Tabelle 17 dargestellt.

Column statistics	Age (years)	AIN with normal CRP	AIN with high CRP	Hematopoietic insufficiency	Viral infection	Others
Number of values (in total 59 values)		14	9	16	8	12
Minimum	0,1139	3,283	82,16	40,64	141,3	4,289
25% Percentile	1,022	17,89	102,5	57,09	184,6	12,52
<b>Median</b>	2,622	31,59	149,8	79,60	272,8	22,72
75% Percentile	10,76	45,71	228,0	389,6	1095	44,76
Maximum	18,16	62,28	301,4	618,6	2635	54,60
<b>Mean</b>	5,762	31,49	166,6	206,6	698,5	25,84
Std. Deviation	5,869	18,53	73,15	202,2	865,8	17,20
Std. Error	0,7641	4,952	24,38	50,55	306,1	4,966
Lower 95% CI of mean	4,232	20,79	110,3	98,85	-25,31	14,91
Upper 95% CI of mean	7,291	42,19	222,8	314,3	1422	36,77
Sum	339,9	440,9	1499	3305	5588	310,1

**Tabelle 17. Statistische Analyse der Patientenproben.** In dieser Tabelle ist die statistische Analyse der 5 Patientengruppen dargestellt. Pro Gruppe sind Zahl der Proben, Median und Mean, maximale und minimale Werte und Perzentilen dargestellt.

**Gruppe I - Autoimmunneutropenien (AIN) mit normalen CRP.** Hier sind Patienten mit AIN mit oder ohne bestätigten Antikörpernachweis. Während der Studie ist uns kein Zusammenhang zwischen G-CSF- Spiegel und des Vorhandenseins/Fehlen der Antikörper gegen neutrophile Granulozyten aufgefallen, weswegen diese nicht extra unterteilt worden sind. Es sind 14 Patientenproben, die einen normalen CRP-Wert aufweisen und keine Zeichen eines Infekts zum Zeitpunkt der Blutentnahme gezeigt haben. Deren G-CSF Werte liegen im Bereich von **3,2 - 62,2 pg/ml**, Median bei 31,5 pg/ml und Mean bei 31,4 pg/ml  $\pm$ 4,952 pg/ml.

**Gruppe II – Autoimmunneutropenien (AIN) mit hohem CRP.** Hier sind Patienten mit AIN, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme einen bakteriellen Infekt hatten und das unabhängig vom Vorhandensein/Fehlen der Antikörper gegen neutrophile Granulozyten. Insgesamt sind es 9 Patientenproben mit G-CSF Werten im Bereich von **82,1 - 301,4 pg/ml**, Median von 149,8 pg/ml und Mean von 166,6 pg/ml.

**Gruppe III – Bildungsstörungen (hämatopoetische Insuffizienz).** Hier sind Patienten mit MDS, ALPS, SAA und andere auf Knochenmark negativ wirkende Krankheiten ohne klinische Infektzeichen. Das sind 16 Patientenproben mit G-CSF Werten im Bereich von **40,6 - 618,6 pg/ml**, Median von 79,6 pg/ml und Mean von 206,6 pg/ml  $\pm$ 50,55 pg/ml.

**Gruppe IV – Virale Infektionen.** Hier sind Patienten mit unterschiedlicher Ausprägung der viralen Infektion mit EBV, CMV, HSV und anderen viralen Erkrankungen dargestellt. Insgesamt sind es 8 Patientenproben mit G-CSF Werten im Bereich von **141,3 - 2635,0 pg/ml**, Median von 272,8 pg/ml und Mean von 698,5 pg/ml.

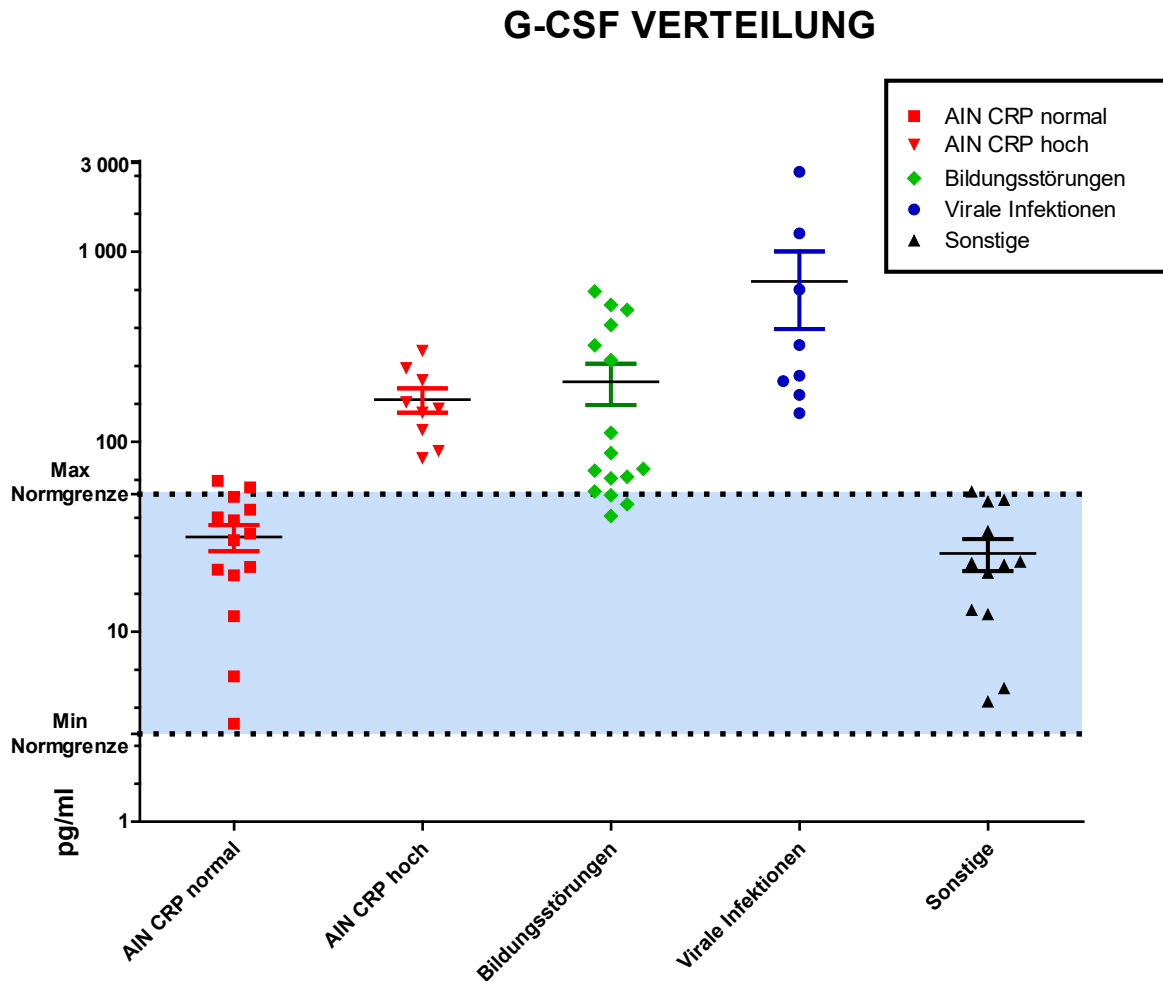
**Gruppe V – Sonstige.** Diese Gruppe beinhaltet verschiedene Krankheiten, bei denen zum Zeitpunkt der Vorstellung bei PHOS bei der Blutentnahme eine Neutropenie bestätigt worden ist und diese nicht zu den Gruppen I-IV gepasst hat (Tab.18). Das sind 12 Patientenproben mit G-CSF Werten im Bereich von **4,2 - 54,6 pg/ml**, Median von 22,7 pg/ml und Mean von 25,8 pg/ml (Tab.17).

ID	Krankheit	Geschlecht (W/M)	Alter (Jahre)	Granulozyten (/ $\mu$ )	G-CSF (pg/ml)
4	Pfortadertrombose	M	10,02	1500	5,03
5	Panzytopenie unklarer Genese. Konstitutionelle Entwicklungsverzögerung	M	9,11	1450	13,00
8	Wiskott-Aldrich-Syndrom	M	3,8	336	23,33
15	X-Adrenoleukodystrophie	M	8,78	5400	54,60
32	Kongenitale Pfortadertrombose	W	12,36	2000	4,29
38	Trombozytopenie	W	16,24	1904	48,44
41	Erythroblastophthise	M	0,12	740	22,97
43	Hämolytische Anämie	W	2,95	2100	33,74
45	Panzytopenie unklarer Genese	W	0,18	334	22,47
54	Z.n. Lebertransplantation	W	1,06	9600	49,41
56	Sonstige Agranulozytose	M	13,89	1018	20,42
58	Z.n. Lebertransplantation	M	1,41	400	12,36

**Tabelle 18. Gruppe V- Sonstige.** Hier sind die verschiedenen Krankheiten der Gruppe V – Sonstige vorgestellt.

Mit dem ANOVA one way Test wurde überprüft, ob es einen Unterschied der Patientengruppen zueinander gibt. Mit  $p < 0,0003$  \*\*\* ist der Unterschied hoch Signifikant ( $p < 0,05$ ).

Da meine Referenzgrenze für den G-CSF-Spiegel zwischen 2,9 - 53,0 pg/ml liegt, wurde die Graphik mit der G-CSF Verteilung der Patientenproben (Abb.9) durch diese Referenzgrenze ergänzt (Abb.10).



**Abbildung 10. G-CSF Verteilung mit der Referenzgrenze.** Die Graphik zeigt die gruppierte Verteilung der G-CSF-Werte und deren Zusammenhang mit der Referenzgrenze von 2,9 - 53,0 pg/ml. X-Achse-

Gruppenverzeichnis. Y-Achse- G-CSF-Wert in pg/ml. ■ – AIN CRP normal, ▼ - AIN CRP hoch, ◆ - Bildungsstörungen, ● - Virale Infektionen, ▲- Sonstige.

Durch diese Referenzgrenze mit 2,9 – 53,0 pg/ml sieht man, dass die Gruppe I (AIN) mit normalen CRP und die Gruppe V (Sonstige) hauptsächlich im Referenzbereich liegen, Gruppe II (AIN) mit hohem CRP, Gruppe III (Bildungsstörungen) und Gruppe IV (Virale Infektionen) deutlich drüber liegen.

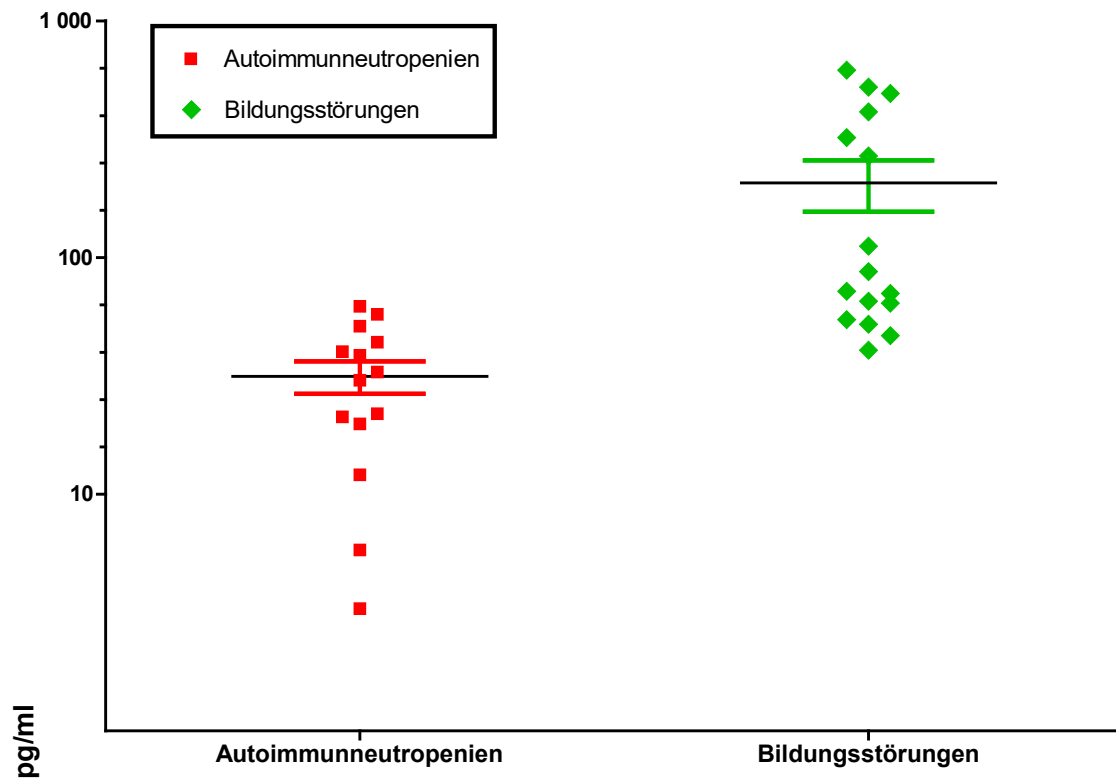
Für die richtige Auswertung des G-CSFs ist uns wichtig Patientenproben ohne akuten Infekt Zeichen zu beurteilen. Da Patienten der Gruppe I (AIN) mit hohem CRP und Gruppe IV (Virale Infektionen) zum Zeitpunkt der Probenentnahme einen akuten Infekt aufweisen und die G-CSF-Werte deswegen deutlich über die grobe Referenzgrenze liegen, und die Gruppe V außer Neutropenie keinen weiteren Zusammenhang aufweisen wurden diese Gruppen weiter nicht einzeln betrachtet.

Aus diesem Grund haben wir die zu unserer Studie passende Gruppen (Gruppe I AIN mit normalen CRP und Gruppe III Bildungsstörungen) im weiteren Verlauf miteinander verglichen. Dazu wurden die Gruppennamen korrigiert:

**Gruppe I – Autoimmunneutropenien** (Patienten mit AIN ohne Infekt Zeichen).

**Gruppe II – Bildungsstörungen** (Patienten mit hämatopoetischer Insuffizienz ohne Infekt Zeichen) (Abb.11).

## G-CSF Verteilung der Hauptgruppen



**Abbildung 11. G-CSF Verteilung der Hauptgruppen.** Die Graphik zeigt die Verteilung der G-CSF Werte der 2 Hauptgruppen. X-Achse - Gruppenverzeichnis. Y-Achse- G-CSF-Wert in pg/ml.

■ – Autoimmunneutropenien, ◆ - Bildungsstörungen.

Mit Hilfe des T-Tests haben wir überprüft, ob der Unterschied zwischen den zwei Gruppen groß genug ist, um zu bestätigen, dass die Gruppen verschieden sind (Tabelle 19).



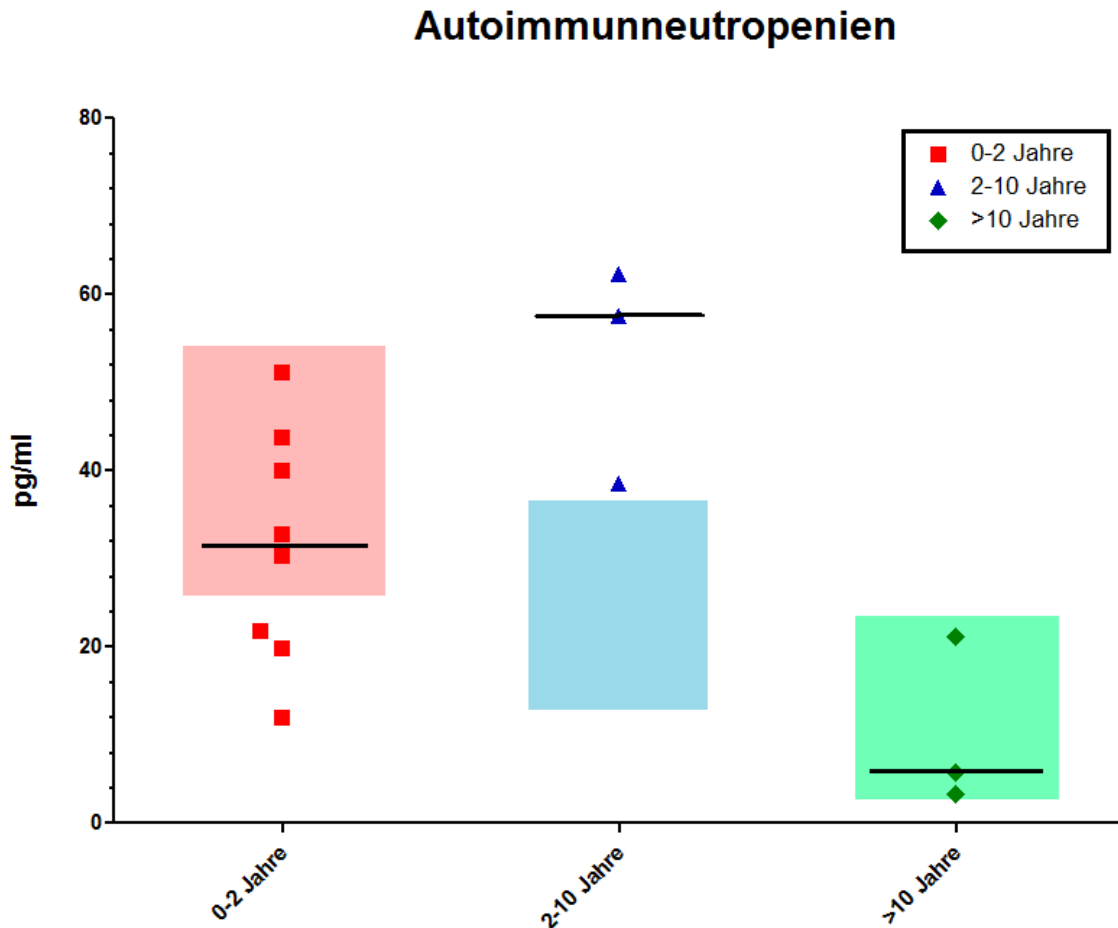
<b>Table analysis</b>	<b>Patient samples</b>
Group I	Autoimmune neutropenia
Vs	vs
Group II	Hematopoietic insufficiency
<b>Unpaired T test</b>	
P value	0,0032
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.221 df=28
<b>How big is the difference?</b>	
Mean ± SEM of Group I	31.49 ± 4.952 N=14
Mean ± SEM of Group II	206.6 ± 50.55 N=16
Difference between means	-175.1 ± 54.35
95% confidence interval	-286.4 to -63.78
R squared	0,2704

**Tabelle 19. T-Test der Patientengruppen.** Die Tabelle zeigt die Ergebnisse des T-Tests, dass den Unterschied zwischen der Gruppe I (Autoimmunneutropenien) und Gruppe II (Bildungsstörungen) bestimmt.

Der Unterschied zwischen der Gruppe I (Autoimmunneutropenien) und Gruppe II (Bildungsstörungen) ist bei  $p < 0,0032$  \*\* und somit statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2.1. Gruppe I – Autoimmunneuropenien

Die Gruppe der Autoimmunneuropenien beinhaltet 14 Patientenproben. Laut den Altersgrenzen der Referenzwerte wird die entsprechend auf 3 Untergruppen unterteilt (Abb. 12).



**Abbildung 12. Autoimmunneuropenien.** Die Graphik zeigt die Verteilung der G-CSF Werte in der Gruppe der Autoimmunneuropenien entsprechend den Altersgruppen und Referenzwerten. X-Achse – Altersgruppen. Y-Achse- G-CSF-Wert in pg/ml. ■ – 0-2 Jahre, ▲ - 2-10 Jahre, ◆ >10 Jahre. ■ -Referenzbereich für G-CSF (0-2 Jahre) von 26,0-53,0 pg/ml, ■ - Referenzbereich für G-CSF (2-10 Jahre) von 14,0-37,0 pg/ml, ■ - Referenzbereich für G-CSF (>10 Jahre) von 2,9- 23,0 pg/ml. — Mean Werte für G-CSF: 0-2 Jahre=31,6 pg/ml, 2-10 Jahre =57,6 pg/ml, >10 Jahre = 5,8 pg/ml.

Die Tabelle 20 zeigt die statistische Analyse zu dieser Graphik.

Column statistics	Age (years)	Autoimmune neutropenia	0-2 years	2-10 years	>10 years
Number of values (in total 59 values)		14	8	3	3
Minimum	0,1139	3,283	12,08	38,64	3,283
25% Percentile	1,022	17,89	20,34	38,64	3,283
<b>Median</b>	2,622	31,59	31,59	57,57	5,816
75% Percentile	10,76	45,71	42,90	62,28	21,21
Maximum	18,16	62,28	51,25	62,28	21,21
<b>Mean</b>	5,762	31,49	31,51	52,83	10,10
Std. Deviation	5,869	18,53	13,22	12,51	9,700
Std. Error	0,7641	4,952	4,675	7,224	5,600
Lower 95% CI of mean	4,232	20,79	20,46	21,75	-13,99
Upper 95% CI of mean	7,291	42,19	42,57	83,91	34,20
Sum	339,9	440,9	252,1	158,5	30,31

**Tabelle 20. Statistische Analyse der Autoimmunneutropenien.** In dieser Tabelle ist die statistische Analyse der 3 Patientengruppen mit Autoimmunneutropenien entsprechend den Altersgruppen und Referenzwerten dargestellt. Pro Gruppe sind Zahl der Proben, Median und Mean, maximale und minimale Werte und Perzentilen dargestellt.

Die erste Gruppe beinhaltet 8 AIN in der Altersgruppe zwischen 0 und 2 Jahren mit den minimalen (12,0 pg/ml) und maximalen (51,2 pg/ml) G-CSF Werten, Median von 57,5 pg/ml und Mean von 31,5 pg/ml. Wie in der Abbildung 12 zu sehen ist, liegen die G-CSF Werte Großteils im Referenzbereich.

Die zweite Gruppe sind 3 AIN in der Altersgruppe zwischen 2 und 10 Jahren mit den minimalen (38,6 pg/ml) und maximalen (62,2 pg/ml) G-CSF Werten, Median und Mean von 52,8 pg/ml. Die G-CSF Werte dieser Gruppe liegen außerhalb des Referenzbereichs (Abb.12).

Die letzte Gruppe besteht aus 3 AIN in der Altersgruppe ab 10 Jahren mit den minimalen (3,2 pg/ml) und maximalen (21,2 pg/ml) G-CSF Werten, Median von 5,8 pg/ml und Mean von 10,1 pg/ml. Diese liegen komplett im Referenzbereich (Abb.12)

Der T-Tests hat uns geholfen den Unterschied zwischen den Altersgruppen zu bestimmen (Tabelle 21).

Table analysis	Autoimmun e neutropenia	Table Analysis	Autoimmun e neutropenia	Table Analysis	Autoimmune neutropenia
Group 1	0-2 years	Group 2	2-10 years	Group 1	0-2 years
Vs	vs	Vs	vs	Vs	Vs
Group 2	2-10 years	Group 3	>10 years	Group 3	>10 years
Unpaired T test		Unpaired T test		Unpaired T test	
P value	0,0393	P value	0,0095	P value	0,0325
P value summary	*	P value summary	**	P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two- tailed P value?	Two-tailed	One- or two- tailed P value?	Two-tailed	One- or two- tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.410 df=9	t, df	t=4.674 df=4	t, df	t=2.525 df=9
How big is the difference?		How big is the difference?		How big is the difference?	
Mean ± SEM of Group 1	31.51 ± 4.675 N=8	Mean ± SEM of Group 2	52.83 ± 7.224 N=3	Mean ± SEM of Group 1	31.51 ± 4.675 N=8
Mean ± SEM of Group 2	52.83 ± 7.224 N=3	Mean ± SEM of Group 3	10.10 ± 5.600 N=3	Mean ± SEM of Group 3	10.10 ± 5.600 N=3
Difference between means	-21.32 ± 8.847	Difference between means	42.73 ± 9.140	Difference between means	21.41 ± 8.480
95% confidence interval	-41.33 to - 1.305	95% confidence interval	17.35 to 68.10	95% confidence interval	2.227 to 40.59
R squared	0,3921	R squared	0,8453	R squared	0,4146

**Tabelle 21. T-Test Auswertung der Medianwerte der Autoimmunneutropenien.**

Der Unterschied zwischen der Gruppe 1 (0-2) und Gruppe 2 (2-10) ist bei  $p < 0,0393$  \* und somit statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

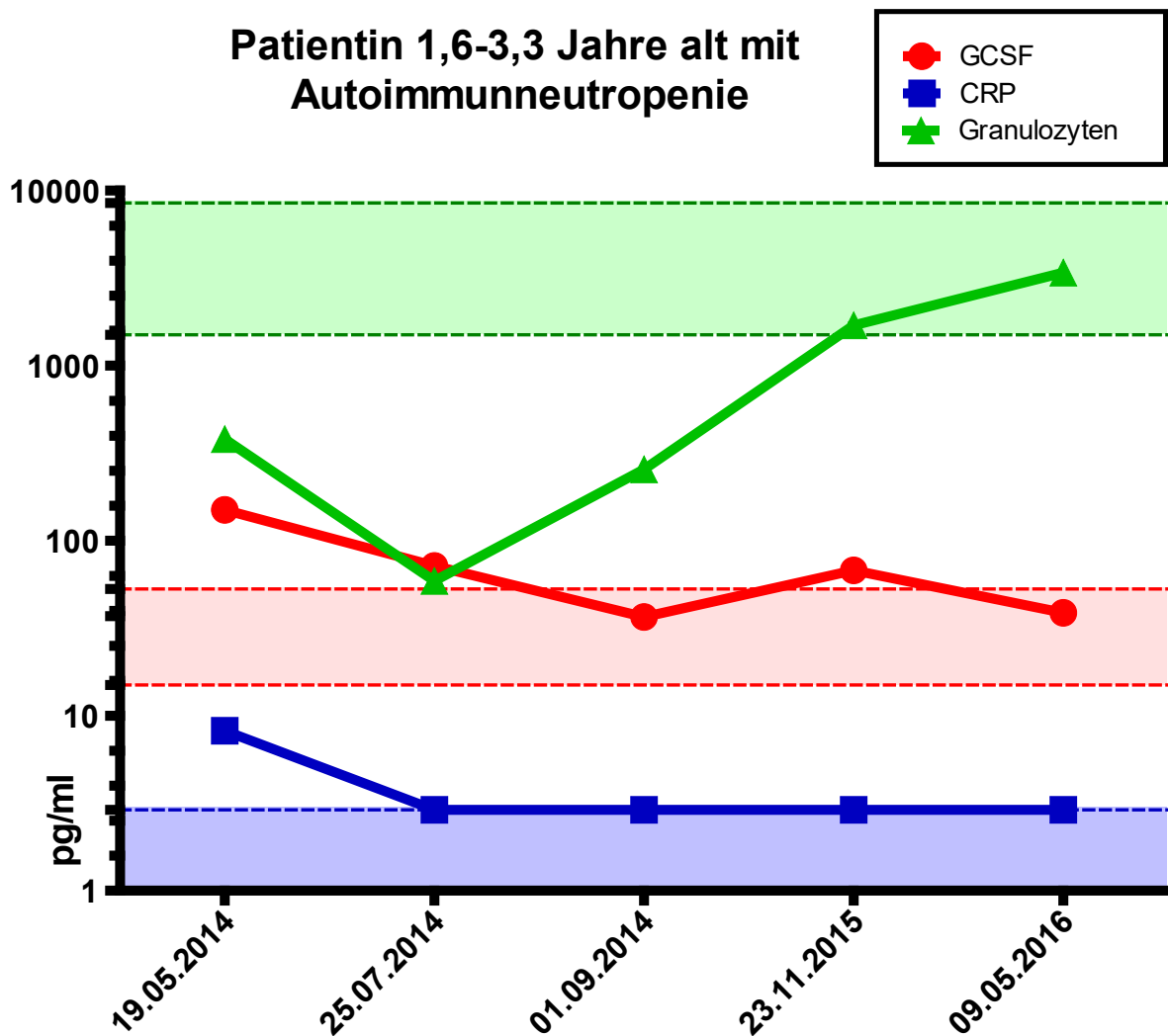
Der Unterschied zwischen der Gruppe 2 (2-10) und Gruppe 3 (>10) ist bei  $p < 0,0095$  \*\* und somit statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

Der Unterschied zwischen der Gruppe 1 (0-2) und der Gruppe 3 (>10) ist bei  $p < 0,0325$  \* und somit statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

Somit ist die G-CSF Verteilung in der Gruppe I (Autoimmunneutropenien) zwischeneinander signifikant (ANOVA one way Test)  $p < 0,0054$  \*\*.

In der Abbildung 13 ist ein Beispiel mit dem Verlauf der AIN altersabhängig vorgestellt. Hier sieht man deutlich den Zusammenhang der AIN von dem CRP Wert. Bei normalem CRP liegt der G-CSF Spiegel im Normbereich. Wenn das CRP wegen einem Infekt zu hoch ist steigt auch das G-CSF Spiegel deutlich über den Referenzbereich für das entsprechende Alter. Die Granulozytenzahl sind unter

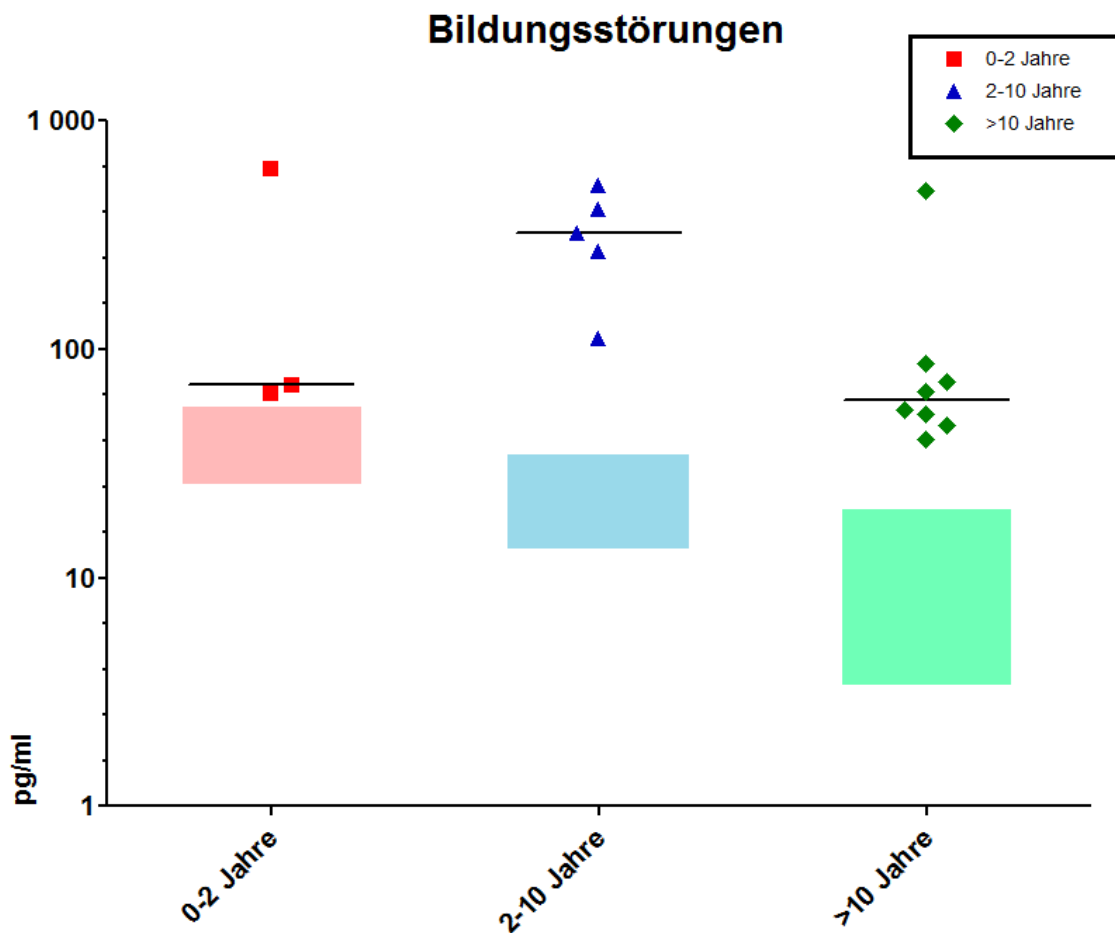
1000/ml. Beim hohem CRP, was auf einen Infekt deutet, geht es reaktiv nach oben. Im Verlauf sieht man die Tendenz zur Normalisierung der Werte.



**Abbildung 13. Beispiel: Autoimmunneutropenien im Verlauf.** X-Achse – Datum der Probenentnahme. Y-Achse – G-CSF-Wert in pg/ml. Oben in der Mitte Patientendaten: Geschlecht, Alter, Diagnose. Oben rechts: ● - G-CSF, ■ - CRP, ▲ -Granulozyten. Farben Felder für Referenzbereiche: blau- CRP, rot – G-CSF, grün- Granulozyten.

#### 4.2.2.2. Gruppe II – Bildungsstörungen (hämatopoetische Insuffizienz)

Die Gruppe der Bildungsstörungen beinhaltet 16 Patientenproben. Laut den Altersgrenzen der Referenzwerte wird sie entsprechend auf 3 Untergruppen unterteilt (Abb. 14).



**Abbildung 14. Bildungsstörungen.** Die Graphik zeigt die Verteilung der G-CSF Werte in der Gruppe der Bildungsstörungen entsprechend der Altersgruppen und Referenzwerten. X-Achse – Altersgruppen. Y-Achse- G-CSF-Wert in pg/ml. ■ – 0-2 Jahre, ▲ - 2-10 Jahre, ◆ - >10 Jahre. ■ - Referenzbereich für G-CSF (0-2 Jahre) von 26,0-53,0 pg/ml, ■ - Referenzbereich für G-CSF (2-10 Jahre) von 14,0-37,0 pg/ml, ■ - Referenzbereich für G-CSF (>10 Jahre) von 2,9- 23,0 pg/ml. — Mean Werte für G-CSF: 0-2 Jahre=31,6 pg/ml, 2-10 Jahre =57,6 pg/ml, >10 Jahre = 5,8 pg/ml.

Auf der Abbildung 14 sehen wir die G-CSF Werte in der Gruppe der Bildungsstörungen, was uns zeigt, dass diese deutlich über die Referenzwerte der jeweiligen Altersgruppe liegen.

Die Tabelle 22 zeigt uns die statistische Analyse dieser Gruppe.

<b>Column statistics</b>	<b>Age (years)</b>	<b>Hematopoietic insufficiency</b>	<b>0-2 years</b>	<b>2-10 years</b>	<b>&gt;10 years</b>
Number of values (in total 59 values)		16	3	5	8
Minimum	0,1139	40,64	64,22	111,6	40,64
25% Percentile	1,022	57,09	64,22	190,1	48,18
<b>Median</b>	2,622	79,60	70,52	321,6	60,02
75% Percentile	10,76	389,6	618,6	468,7	83,43
Maximum	18,16	618,6	618,6	525,0	493,9
<b>Mean</b>	5,762	206,6	251,1	327,8	114,1
Std. Deviation	5,869	202,2	318,3	155,2	154,2
Std. Error	0,7641	50,55	183,8	69,40	54,52
Lower 95% CI of mean	4,232	98,85	-539,5	135,1	-14,80
Upper 95% CI of mean	7,291	314,3	1042	520,5	243,0
<b>Sum</b>	339,9	3305	753,4	1639	912,9

**Tabelle 22. Statistische Analyse der Bildungsstörungen.** In dieser Tabelle ist die statistische Analyse der 3 Patientengruppen mit Bildungsstörungen entsprechend der Altersgruppen und Referenzwerten dargestellt. Pro Gruppe sind Zahl der Proben, Median und Mean, maximale und minimale Werte und Perzentilen dargestellt.

Die erste Gruppe beinhaltet 3 Patientenproben in der Altersgruppe zwischen 0 und 2 Jahren mit den minimalen (64,2 pg/ml) und maximalen (618,6 pg/ml) G-CSF Werten, Median von 70,5 pg/ml und Mean von 251,1 pg/ml.

Die zweite Gruppe sind 5 Patientenproben in der Altersgruppe zwischen 2 und 10 Jahren mit den minimalen (111,6 pg/ml) und maximalen (525,0 pg/ml) G-CSF Werten, Median von 321,6 pg/ml und Mean von 327,8 pg/ml.

Die letzte Gruppe besteht aus 8 Patientenproben in der Altersgruppe ab 10 Jahren mit den minimalen (40,6 pg/ml) und maximalen (493,9 pg/ml) G-CSF Werten, Median von 60,0 pg/ml und Mean von 114,1 pg/ml.

Der T-Tests hat uns geholfen den Unterschied zwischen den Altersgruppen in der Gruppe der Bildungsstörungen zu bestimmen (Tab.23).

Table analysis	Hematopoietic insufficiency	Table analysis	Hematopoietic insufficiency	Table analysis	Hematopoietic insufficiency
Group 1	0-2 years	Group 2	2-10 years	Group 1	0-2 years
Vs	vs	vs	vs	Vs	vs
Group 2	2-10 years	Group 3	>10 years	Group 3	>10 years
<b>Unpaired T test</b>		<b>Unpaired T test</b>		<b>Unpaired T test</b>	
P value	0,6546	P value	0,0337	P value	0,3437
P value summary	ns	P value summary	*	P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes	Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.4706 df=6	t, df	t=2.426 df=11	t, df	t=0.9994 df=9
<b>How big is the difference?</b>		<b>How big is the difference?</b>		<b>How big is the difference?</b>	
Mean ± SEM of Group 1	251.1 ± 183.8 N=3	Mean ± SEM of Group 2	327.8 ± 69.40 N=5	Mean ± SEM of Group 1	251.1 ± 183.8 N=3
Mean ± SEM of Group 2	327.8 ± 69.40 N=5	Mean ± SEM of Group 3	114.1 ± 54.52 N=8	Mean ± SEM of Group 3	114.1 ± 54.52 N=8
Difference between means	-76.71 ± 163.0	Difference between means	213.7 ± 88.11	Difference between means	137.0 ± 137.1
95% confidence interval	-475.6 to 322.2	95% confidence interval	19.79 to 407.6	95% confidence interval	-173.1 to 447.1
R squared	0,03560	R squared	0,3485	R squared	0,09989

**Tabelle 23. T-Test Auswertung der Medianwerte der Bildungsstörungen.**

Der Unterschied zwischen der Gruppe 1 (0-2) und Gruppe 2 (2-10) ist bei  $p < 0,6546$  und somit statistisch nicht signifikant ( $p < 0,05$ ).

Der Unterschied zwischen der Gruppe 2 (2-10) und Gruppe 3 (>10) ist bei  $p < 0,0337$  und somit statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

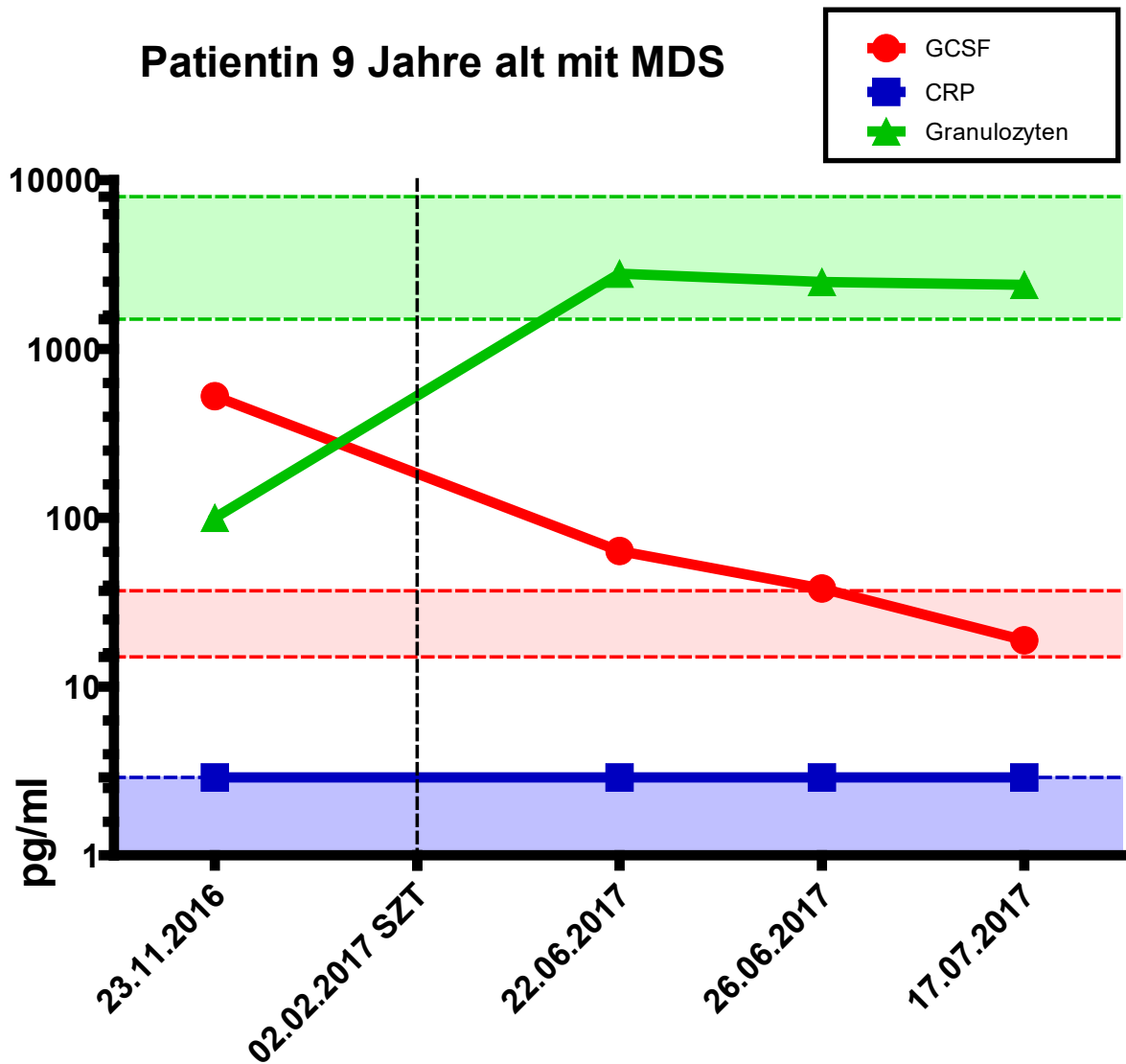
Der Unterschied zwischen der Gruppe 1 (0-2) und der Gruppe 3 (>10) ist bei  $p < 0,3437$  und somit statistisch nicht signifikant ( $p < 0,05$ ).

Die G-CSF Verteilung in der Gruppe II (Bildungsstörungen) zwischeneinander ist nicht signifikant (ANOVA one-way-Test)  $p < 0,1664$ .

Diesbezüglich macht es keinen Sinn die Gruppe II (Bildungsstörungen) altersabhängig zu betrachten.

In der Abbildung 15 ist ein Beispiel mit dem Verlauf der Werte von 9-jähriger Patientin mit Knochenmarksbildungsstörung (MDS) vorgestellt.





**Abbildung 15. Bildungsstörungen im Verlauf.** Patientin 9 Jahre alt mit MDS. X-Achse – Datum der Probenentnahme mit SZT. Y-Achse – G-CSF-Wert in pg/ml. Oben in der Mitte Patientendaten: Geschlecht, Alter, Diagnose. Oben rechts: ● - G-CSF, ■ - CRP, ▲ -Granulozyten. Farben Felder für Referenzbereiche: blau- CRP, rot – G-CSF, grün- Granulozyten.

Wie man hier sehen kann, besteht kein Zusammenhang des G-CSF-Spiegels hinsichtlich des Alters, da die G-CSF-Werte weit von den Referenzbereichen hinaus liegen. Bei einem normalen CRP ohne bakterielle und virale Infekte sieht man deutlich erhöhte G-CSF-Werte und niedrige Granulozytenzahl, was uns auf das Vorliegen einer Knochenmarkdepression hinweisen kann. Man sieht deutlich, dass die G-CSF-Werte vor der SZT deutlich über die Referenzgrenze liegen, die Granulozytenzahl extrem niedrig ist und ein normales CRP ohne Infekt vorliegt. Nach der SZT sehen wir im Verlauf, dass die Werte sich normalisieren. Das nimmt eine gewisse Zeit in Anspruch.

### 4.2.3. Sensitivität und Spezifität

Mit Hilfe der 4-Felder Tafel (Abb.16) wird die Sensitivität und Spezifität unseres Testverfahrens bestimmt.

	Person ist krank	Person ist gesund	Gesamt
Test positiv G-CSF ist hoch	Bildungsstörungen 16	Falsch positiv 2	<b>18</b>
Test negativ G-CSF ist niedrig	Falsch negativ 3	Autoimmunneutropenien 12	<b>15</b>
Gesamt	<b>19</b>	<b>14</b>	<b>33</b>

*Abbildung 16. 4-Felder Tafel des Testverfahrens. Rotes Feld: Patienten, die an einer Knochenmarkbildungsstörung leiden. Grünes Feld: Patienten mit einer Autoimmunneutropenie. Dazu noch die Gesamtzahl der positiven/negativen Testergebnisse (rechts oben) und Gesamtzahl der kranken/gesunden Patienten (Links unter).*

**Sensitivität** gibt den Anteil der korrekt als positiv (krank, Bildungsstörungen) klassifizierten Patienten in der Gesamtheit der tatsächlich positiven Patienten an. Einfacher gesagt es zeigt die Patienten mit hohem G-CSF Spiegel an, die an einer Knochenmarkbildungsstörung leiden.

Die Formel lautet:

$$\begin{aligned}
 \text{Sensitivität} &= \frac{\text{Anzahl richtig positiver}}{(\text{Anzahl richtig positiver} + \text{Anzahl falsch negativer})} \\
 &= \frac{16}{(16 + 3)} = 0,84 \text{ (84\%)}
 \end{aligned}$$

Somit liegt die Sensitivität bei **0,84 (84 %)**.

**Falsch-negativ-Rate** - der Anteil der fälschlich als negativ (gesund, AIN) klassifizierten Patienten werden in der Gesamtheit der tatsächlich positiven (krank, Bildungsstörungen) Patienten angezeigt. Einfacher gesagt die Fähigkeit tatsächlich

krankte Patienten mit Knochenmarkbildungsstörungen als gesund mit niedrigem G-CSF Spiegel zu diagnostizieren.

Die Formel lautet:

$$\begin{aligned} \text{Falsch – negativ – Rate} &= \frac{\text{Anzahl falsch negativer}}{(\text{Anzahl richtig positiver} + \text{Anzahl falsch negativer})} \\ &= \frac{3}{(16 + 3)} = 0,16 \text{ (16\%)} \end{aligned}$$

Somit liegt die Falsch-negative-Rate bei **0,16 (16 %)**.

Mit der **Spezifität** wird der Anteil der korrekt als negativ (gesund, AIN) klassifizierten Patienten an der Gesamtheit der in Wirklichkeit negativen (gesunden, AIN) Patienten bestimmt. Einfacher gesagt die Spezifität bezeichnet die Fähigkeit tatsächlich Gesunde als gesund mit niedrigem G-CSF Spiegel zu identifizieren.

Man berechnet es folgender Mase:

$$\begin{aligned} \text{Spezifität} &= \frac{\text{Anzahl richtig negativer}}{(\text{Anzahl richtig negativer} + \text{Anzahl falsch positiver})} \\ &= \frac{12}{(12 + 2)} = 0,86 \text{ (86\%)} \end{aligned}$$

Somit liegt die Spezifität bei **0,86 (86 %)**.

Entsprechend gibt die **Falsch-positiv-Rate** - den Anteil der fälschlich als positiv (krank, Bildungsstörungen) klassifizierten Patienten an, die in Wirklichkeit negativ (gesund) sind. Das bedeutet, dass ein tatsächlich Gesunder zu Unrecht als Patient mit Knochenmarksbildungsstörung und hohem G-CSF Spiegel diagnostiziert wird.

So wird es gerechnet:

$$\begin{aligned} \text{Falsch – positiv – Rate} &= \frac{\text{Anzahl falsch positiver}}{(\text{Anzahl richtig negativer} + \text{Anzahl falsch positiver})} \\ &= \frac{2}{(12 + 2)} = 0,14 \text{ (14\%)} \end{aligned}$$

Somit liegt die Falsch-positiv-Rate bei **0,14 (14 %)**.

**Positiver prädiktiver Wert (PPW)** - gibt den Anteil der korrekt als positiv (krank, Bildungsstörungen) klassifizierten Ergebnisse in der Gesamtheit der als positiv (krank) klassifizierten Ergebnisse an. Dies ergibt, wie viele Patienten, die positiv mit hohem G-CSF Spiegel getestet worden sind und tatsächlich eine Knochenmarkbildungsstörung haben.

Es wird wie folgt gerechnet:

$$\begin{aligned} PPW &= \frac{\text{Anzahl richtig positiver}}{(\text{Anzahl richtig positiver} + \text{Anzahl falsch positiver})} = \frac{16}{(16 + 2)} \\ &= \mathbf{0,89 (89\%)} \end{aligned}$$

Somit ist der positiver prädiktiver Wert **0,89 (89 %)**.

**- negativer prädiktiver Wert (NPW)** - gibt den Anteil der korrekt als negativ (gesund, AIN) klassifizierten Ergebnisse in der Gesamtheit der als negativ (gesund) klassifizierten Ergebnisse an. Das zeigt uns den Anteil der Personen mit negativem Testergebnis an, die auch tatsächlich „gesund“ sind und somit eine AIN haben.

Man berechnet es wie folgt:

$$\begin{aligned} NPW &= \frac{\text{Anzahl richtig negativer}}{(\text{Anzahl richtig negativer} + \text{Anzahl falsch negativer})} = \frac{12}{(12 + 3)} \\ &= \mathbf{0,8 (80\%)} \end{aligned}$$

Der negative prädiktive Wert ist **0,8 (80 %)**.

## 5. DISKUSSION

Meine Doktorarbeit habe ich an der PHOS der UKR im Zeitraum von November 2015 bis März 2022 gemacht.

Ziel des Vorhabens war zu untersuchen, ob der G-CSF-Spiegel einen Rückschluss auf die Krankheitsursache bei unklarer Neutropenie zulässt oder nicht. Wir wollten prüfen, ob man anhand der G-CSF-Spiegelbestimmung eine Bildungsstörung (hämatopoetische Insuffizienz) von einem immunologischen Geschehen unterscheiden kann.

Neutropenien können mehrere Ursachen haben. Die meisten sind AIN, diese sind harmlos. Eine hämatopoetische Insuffizienz kann Ursache eines schweren angeborenen oder erworbenen Defektes sein, was zu tödlichen Infektionen führen kann. Das Knochenmark kann durch Medikamente, Gifte, virale Infektionen (CMV, EBV, HSV...) und neoplastische Prozesse angegriffen sein. Manchmal ist die Ursache unklar [2], [5], [6], [7]. Die Besonderheiten hämatologischer und onkologischer Krankheitsbilder sind in den verschiedenen Altersstufen sehr vielfältig. Das frühe Unterscheiden der Ursache der unklaren Neutropenien bei den kleinen Patienten hätte uns geholfen Zeit zu gewinnen, um den klinischen Verlauf zu verbessern und zu verkürzen. Manchmal ist es unklar, ob der Prozess bösartig oder gutartig ist, ob der Patient sofort eine Therapie braucht oder wir alles nur im Auge behalten und das nur beobachten müssen. Mit meinem Forschungsvorhaben (G-CSF-Spiegelbestimmung) wollte ich eine neue Diagnostische Möglichkeit prüfen, die den Ärzten in dieser Situation die Entscheidung erleichtert und das Leben der kleinen Patienten verbessert.

In meinen Untersuchungen habe ich die Blutbild- und laborchemischen Veränderungen untersucht. Ich habe 116 Patientenproben (Serum) von 59 Patienten aus dem Bereich der PHOS der UKR im Alter zwischen 1 Monat und 18 Jahren blind bearbeitet. Diese wurden speziell für die Studie von Februar 2010 bis August 2017 asserviert.

Damit wir die Ergebnisse der G-CSF-Spiegelbestimmung richtig beurteilen konnten, bräuchten wir deren festgestellte Referenzwerte. Diese wurden nirgendwo in der Literatur beschrieben. Wir müssten selbst die G-CSF-Referenzwerte etablieren. Für dieses Anliegen wurden 42 Probanden (gesunde Personen und Patienten in der Nachsorge) im Alter von 2 Monaten bis 65 Jahren als Kontrollproben untersucht.

Deren G-CSF-Spiegel ist altersabhängig in 3 Gruppen dargestellt (Abb. 8 und Abb. 8a). Dadurch sehen wir, dass der G-CSF-Spiegel mit dem zunehmenden Alter sinkt. Ikeno K. et al. [50] zeigten, dass der G-CSF-Spiegel bei Neugeborenen hoch ist. Sie haben den G-CSF-Spiegel bei Neugeborenen mit und ohne neonatale Komplikationen untersucht, um einige Veränderungen des G-CSF-Spiegels in der Neugeborenen Periode zu untersuchen. Der G-CSF-Spiegel wurde bei 613 Neugeborenen durch ELISA gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass der G-CSF-Spiegel in einem breiten Bereich von dem Niveau unter dem Schnittpunkt (31 pg / ml) bis über den messbaren Bereich (2000 pg / ml) verteilt waren.

Während der Doktorarbeit ist mir aufgefallen, dass solche Faktoren, wie Vorhandensein eines bakteriellen oder viralen Infektes einen Einfluss auf den G-CSF-Spiegel haben. Bei den Patienten mit AIN ohne Infekt Zeichen (normales CRP) liegt der G-CSF-Spiegel im Bereich der Referenzwerte. Bei den Patienten mit AIN mit akuter Infektion (hohes CRP) und Patienten mit viralem Infekt wird ein hoher G-CSF-Spiegel beobachtet (Abb.10).

In der Literatur ist es auch bekannt, dass bei AIN der G-CSF-Spiegel im Referenzbereich liegt [6]. Die Abbildung 13 und [51] zeigen, dass sich der G-CSF-Spiegel bei Patienten mit AIN und aktiver Infektion (erhöhten CRP-Werten) deutlich über den Referenzwerten liegt und nach dem die CRP-Werte sich normalisieren auch ins Referenzbereich runterkommen.

Im Jahr 2013 Alexandropoulou et al. [52] untersuchten Neutropenie im Kindesalter. Die Studie umfasste 161 zuvor gesunde Kinder mit febriler Neutropenie / Leukopenie. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die febrile Neutropenie im Kindesalter in der Regel vorübergehend ist, oft nach viralen und häufigen bakteriellen Infektionen, ohne ernsthafte Komplikationen und in den meisten Fällen spontan zur Remission kommen. Bei einem beträchtlichen Prozentsatz von Patienten wird Neutropenie jedoch zufällig im Verlauf einer Infektion auf dem Boden einer zugrundeliegenden hämatologischen Krankheit entdeckt.

Im Fall von Neutropenie ohne Nachweise von Antikörper gegen Granulozyten, soll die Ursache weiterhin gesucht werden, was letztendlich zur Knochenmarkuntersuchungen führt.

Hier hat unsere G-CSF-Spiegelmessung einen großen Vorteil: es handelt sich um peripheres Blut und sein Serum, das bedeutet keine großen Interventionen, nur ein Piks und das ist sehr wichtig bei Kindern.

Die Abb.14 zeigt die Verteilung der G-CSF Werte der 16 Patienten mit Knochenmarkbildungsstörungen entsprechend der Altersgruppen und Referenzwerten. Diese ist zwischeneinander nicht signifikant (ANOVA one way Test)  $p < 0,1664$ . Diesbezüglich macht es keinen Sinn die Gruppe der Bildungsstörungen altersabhängig zu betrachten.

Wir haben die G-CSF Werte durch die Zeit und klinischen Verlauf der Krankheiten beobachtet. Manche Knochenmarkbildungsstörungen haben letztendlich zur SZT geführt. Abbildung 15 zeigt ein Beispiel von einer Patientin mit MDS. Die CRP Werte waren immer im Normbereich und unabhängig von Alter. Vor der SZT hatte diese Patientin wenig Granulozyten, was mit erhöhten G-CSF Werten korrelierte. Nach der SZT sehen wir die Tendenz zur Normalisierung der Werte: in knapp 5 Monaten Normalisierung der Granulozytenanzahl und in ca. 6 Monaten Referenzbereich des G-CSF-Spiegels. Ähnliche Normalisierung der Laborwerte nach einer SZT konnte man in anderen Patientenverläufen sehen. Somit kann man behaupten, dass das Knochenmark ca. 6 Monaten braucht, um sich zu erholen und seine Funktionen in voller Masse zu erledigen.

Nach der Sensitivität und Spezifität Analyse der G-CSF Werte können wir feststellen, dass ein Patient mit einem hohen G-CSF-Spiegel, mit einer Wahrscheinlichkeit von 84% an einer Knochenmarkbildungsstörung leidet und bei einem normalen G-CSF Spiegel mit einer Wahrscheinlichkeit von 86% an AIN erkrankt ist.

Diese Methode der G-CSF-Spiegelbestimmung ist sehr hilfreich bei Patienten mit unklarer Neutropenie, um dessen Ätiologie zu bestimmen. Somit kann der G-CSF-Spiegel ein unterstützender Marker (Instrument) sein, um eine Neutropenie autoimmuner Genese von einer hämatopoetischer Insuffizienz zu unterscheiden.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Das G-CSF ist ein natürlich vorkommender Wachstumsfaktor, der die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen in Richtung der Granulozytenzellreihe differenziert. G-CSF wird auch bei idiopathischen Störungen der Granulozytenreifung wie der zyklischen Neutropenie eingesetzt.

Während der gesamten Dauer der Doktorarbeit von November 2015 bis März 2020 wurden insgesamt 116 Serumproben von 59 Patienten und 42 Kontrollproben bearbeitet. Bei der Auswertung der Parameter wurden sowohl der klinische Verlauf als auch der laborchemische Verlauf, mit Schwerpunkt auf die Entzündungsparametern (CRP-Wert) analysiert.

Die Kontrollproben wurden in Bezug des Alters und G-CSF-Spiegels in 3 Gruppen geteilt und deren Referenzwerte bestimmt:

- Gruppe 1: 0 bis 2 Jahre, G-CSF Spiegel von 26,0 bis 53,0 pg/ml;
- Gruppe 2: 2 bis 10 Jahre, G-CSF Spiegel von 14,0 bis 37,0 pg/ml;
- Gruppe 3: ab 10 Jahre, G-CSF Spiegel von 2,9 bis 23,0 pg/ml.

Die Patientenproben wurden in Abhängigkeit der Diagnosen zuerst in 5 Gruppen geteilt: Autoimmuneneutropenien mit normalem CRP, Autoimmuneneutropenie mit hohem CRP, Bildungsstörungen (hämatopoetische Insuffizienz), Virale Infektionen und Sonstige. Der G-CSF-Spiegel wird von akuten Infektionen beeinflusst, weswegen wir die Gruppen der AIN mit hohem CRP und Viralen Infektionen nicht mehr einzeln betrachtet haben. Die fünfte Gruppe-Sonstige hatte außer Neutropenie keinen weiteren Zusammenhang zwischeneinander, weswegen auch sie ausgefallen ist. Somit haben wir die Gruppe der AIN mit normalen CRP (umbenannt auf Autoimmunneutropenien) und Gruppe der Bildungsstörungen im weiteren Verlauf miteinander verglichen.

Die Gruppe der Autoimmunneutropenien beinhaltet 14 Patientenproben. Laut den Altersgrenzen der Referenzwerte wird sie entsprechend auf 3 Untergruppen unterteilt. Der G-CSF Spiegel in der ersten Gruppe liegt im Bereich von 12 bis 51,2 pg/ml, in der zweiten Gruppe - von 38,6 bis 62,2 pg/ml und in der dritten Gruppe - von 3,2 bis 21,2 pg/ml. Die G-CSF Werte der zweiten Gruppe liegen außerhalb des Referenzbereichs, dennoch sind alle Werte zwischeneinander statistisch signifikant (ANOVA one way Test)  $p < 0,0054$  \*\*.



Die Gruppe der Bildungsstörung beinhaltet 16 Proben, die Anhand der Altersgrenzen der Referenzwerte auch entsprechend auf 3 Untergruppen unterteilt worden sind. Der G-CSF Spiegel für die erste Gruppe liegt bei 64,2 bis 618,6 pg/ml, für die zweite Gruppe bei 111,6 bis 525,0 pg/ml und für die dritte Gruppe bei 40,6 bis 493,9 pg/ml. Alle G-CSF Werte liegen deutlich außerhalb des Referenzbereichs und sind zueinander statistisch nicht signifikant (ANOVA one way Test)  $p < 0,1664$ . Aus diesem Grund macht es keinen Sinn die Gruppe der Bildungsstörungen altersabhängig zu betrachten.

Nach der Sensitivität und Spezifität Analyse der G-CSF Werte können wir feststellen, dass ein Patient mit einem hohen G-CSF-Spiegel mit einer Wahrscheinlichkeit von 84% an einer Knochenmarkbildungsstörung leidet und bei einem normalen G-CSF Spiegel mit einer Wahrscheinlichkeit von 86% an AIN erkrankt ist.

Die Datenlage deutet daraufhin, dass der G-CSF Wert ein wichtiger Parameter für die Einschätzung der Ätiologie einer unklaren Neutropenie ist und hilft dabei eine onkologische Erkrankung/Bildungsstörung von einer AIN zu unterscheiden.

Hiermit haben wir unser Ziel der Forschungsarbeit erreicht und hoffen, dass man auf der Basis dieser Studie einen Beitrag für die Erscheinung neuer, etablierten Diagnostik Methoden der G-CSF-Spiegelbestimmung festlegt und somit unseren kleinen Patienten schnelle Diagnostik und prompte Therapieentscheidung ermöglicht.

## **7. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNISS**

### **7.1. Abbildungen**

Abbildung 1. Schematische Darstellung der Regulation der Hämatopoese durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren.

Abbildung 2. Kristallstruktur von rekombinantem G-CSF.

Abbildung 3. Zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Infektionen in der Neutropenie und der Granulozytenregeneration.

Abbildung 4. Febrile Neutropenie: Risikobeurteilung und Therapieempfehlung (EORTC/ASCO).

Abbildung 5. Schematische Darstellung der Sandwich ELISA.

Abbildung 6. Herstellung von G-CSF HS Standard Verdünnungsreihe. Quantikine HS ELISA.

Abbildung 7. Beispiel einer Standard-Kurve.

Abbildung 8. Altersverteilung der Kontrollproben.

Abbildung 9. G-CSF- Verteilung der Patientenproben.

Abbildung 10. G-CSF Verteilung mit Referenzgrenzen.

Abbildung 11 . G-CSF Verteilung der Hauptgruppen.

Abbildung 12 . Autoimmunneutropenien.

Abbildung 13. Beispiel: Autoimmunneutropenien im Verlauf.

Abbildung 14 . Bildungsstörungen.

Abbildung 15. Bildungsstörung im Verlauf.

Abbildung 16. 4–Felder Tafel des Testverfahrens.

## 7.2. Tabellen.

Tabelle 1. Schweregrad der Neutropenie nach CTCAE.

Tabelle 2. MASCC-Risikoscore (Multinational Association for Supportive Care in Cancer) der Komplikationen bei Neutropenie.

Tabelle 3. Klassifikation der Neutropenien im Kindes- und Jugendalter.

Tabelle 4. Indikationen zur Therapie mit G-CSF und entsprechende Klassifikation.

Tabelle 5. Daten aus den Patientenakten.

Tabelle 6. Daten der Kontrollpersonen.

Tabelle 7. G-CSF Spiegel der Patientenproben.

Tabelle 8. G-CSF Spiegel der Kontrollproben.

Tabelle 9. Patientendaten und G-CSF Spiegel, entschlüsselt.

Tabelle 10. Daten der Kontrollpersonen mit G-CSF Spiegel, entschlüsselt.

Tabelle 11. 4 - Felder Tafeln.

Tabelle 12. Kontrollproben, kodiert.

Tabelle 13. Statistische Analyse der Kontrollgruppen.

Tabelle 14. T-Test Auswertung der Medianwerte der Kontrollproben.

Tabelle 15. Altersabhängige G-CSF Referenzwerte.

Tabelle 16. Gesamte Patientenproben, kodiert.

Tabelle 17. Statistische Analyse der Patientenproben.

Tabelle 18. Gruppe V Sonstige.

Tabelle 19. T-Test der Patientengruppen.

Tabelle 20. Statistische Analyse der Autoimmunneutropenien.

Tabelle 21. T-Test Auswertung der Medianwerte der Autoimmunneutropenien.


Tabelle 22. Statistische Analyse der Bildungsstörungen.

Tabelle 23. T-Test Auswertung der Medianwerte der Bildungsstörungen.

## 8. ANHANG

### 8.1. Anhang 1. Einwilligungserklärung für Eltern/Erziehungsberechtigte.

Seite 1.

Universitätsklinikum Regensburg Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation	 Universitätsklinikum Regensburg
<b>Forschungsprojekt hämatopoetische Wachstumsfaktoren bei Neutropenie (H-WF)</b>	

Original für Prüfarzt  
Kopie für Patienten  
Kopie für Patientenakte

### Einwilligungserklärung für Eltern/Erziehungsberechtigte

**Patientendaten:** (Patientenetikett)

Name:	
Vorname:	
Geburtsdatum:	Geschlecht: <input type="checkbox"/> weibl.   <input type="checkbox"/> männl.

.....  
Name, Vorname, Geburtsdatum des Erziehungsberechtigten

.....  
Name, Vorname, Geburtsdatum des Erziehungsberechtigten

Wir haben die schriftliche Patienteninformation zum oben genannten Forschungsvorhaben erhalten. Uns wurde eine Kopie unserer unterschriebenen Einwilligungserklärung ausgehändigt. Wir haben beide Dokumente gelesen und verstanden. Wir wurden schriftlich über das Ziel der Studie, unsere Rechte und Pflichten und die Freiwilligkeit der Teilnahme aufgeklärt.

Wir sind mit der Erhebung, Speicherung und Übermittlung von Angaben über die Gesundheit unseres Kindes im Rahmen des Forschungsvorhabens einverstanden.


Wir wurden über die Datenschutzrechte unseres Kindes informiert.

Wir hatten Gelegenheit Fragen zu stellen. Diese wurden zufrieden stellend und vollständig beantwortet. Zusätzlich zu der schriftlichen Information wurden folgende Punkte besprochen:

Untergeordnet H-WF	erstellt von	L. Turowski	am 27.03.2015
Version: 1.0	geprüft von	Dr. M. Malaisé	am
Gültig ab 01.04.2015	genehmigt von	Prof. Dr. S. Corbacioglu	am
C:\Users\I3QYCWG\Desktop\etojenadoskanirovatvsestraniciivsedoki\Patienteninformation und Einwilligung G-CSFAsserviert.docx			Seite 4 von 5



## Anhang 2. Einwilligungserklärung für Jugendliche. Seite 1.

Universitätsklinikum Regensburg Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation	 Universitätsklinikum Regensburg
<b>Forschungsprojekt hämatopoetische Wachstumsfaktoren bei Neutropenie (H-WF)</b>	

Original für Prüfarzt  
Kopie für Patienten  
Kopie für Patientenakte

### Einwilligungserklärung für Jugendliche

**Patientendaten:** (Patientenetikett)

Name:	
Vorname:	
Geburtsdatum:	Geschlecht: <input type="checkbox"/> weibl.   <input type="checkbox"/> männl.

Ich habe die schriftliche Patienteninformation zum oben genannten Forschungsvorhaben erhalten. Mir wurde eine Kopie meiner unterschriebenen Einwilligungserklärung ausgehändigt. Ich habe beide Dokumente gelesen und verstanden. Ich wurde schriftlich und mündlich über das Ziel der Studie, meine Rechte und Pflichten und die Freiwilligkeit der Teilnahme aufgeklärt.

Ich bin mit der Erhebung, Speicherung und Übermittlung von Angaben über meine Gesundheit im Rahmen des Forschungsvorhabens einverstanden.


Ich wurde über die Datenschutzrechte informiert.

Ich hatte Gelegenheit Fragen zu stellen. Diese wurden zufrieden stellend und vollständig beantwortet. Zusätzlich zu der schriftlichen Information wurden folgende Punkte besprochen:

Untergeordnet H-WF	erstellt von	L. Turowski	am 27.03.2015
Version: 1.0	geprüft von	Dr. M. Malaisé	am
Gültig ab 01.04.2015	genehmigt von	Prof. Dr. S. Corbacioglu	am
C:\Users\I3QYCWG\Desktop\tojetojenadoskanirovatvsestraniciivsedok\Patienteninformation und Einwilligung G-CSFJugendliche.docx			Seite 3 von 4



# Anhang 3. Patienteninformation für Eltern/Erziehungsberechtigte. Seite 1.

Universitätsklinikum Regensburg Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation	 Universitätsklinikum Regensburg
<b style="color: blue;">Forschungsprojekt hämatopoetische Wachstumsfaktoren bei Neutropenie (H-WF)</b>	

Original für Patienten

## Patienteninformation für Eltern/Erziehungsberechtigte

**Patientendaten:** (Patientenetikett)

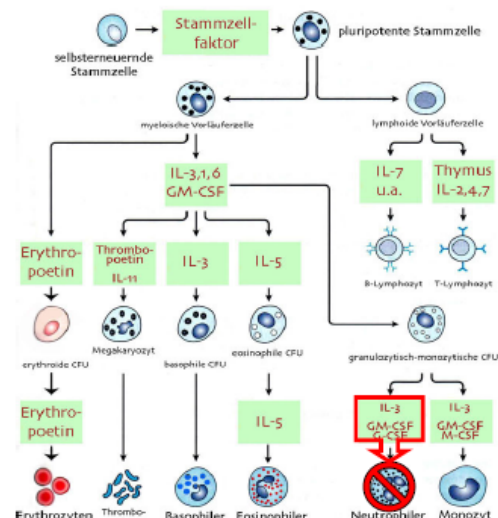
Name:

Vorname:

Geburtsdatum:                      Geschlecht:  weibl. |  männl.

Sehr geehrte/r Eltern/Erziehungsberechtigte/r,

bei Ihrem Kind wurde ein Mangel an einer bestimmten Sorte von weißen Blutkörperchen (Granulozyten) festgestellt. Sie hatten bereits in die Lagerung einer Blutprobe Ihres Kindes eingewilligt. Jetzt startet in unserem Institut ein Forschungsvorhaben mit dem Ziel eine Ursache für die Erkrankung Ihres Kindes zu ermitteln. Falls dies gelingt, können möglicherweise gezieltere Therapieansätze für die Erkrankung gefunden werden. Es ist möglich, dass Ihr Kind durch seine Teilnahme an dieser Studie keinen direkten Nutzen für seine Gesundheit haben wird. Die Ergebnisse dieser Studie sollen jedoch dazu beitragen, dass für andere Patienten mit derselben Erkrankung eine neue Behandlung gefunden wird.




Konkret wird in dieser Studie die im Blut vorhandene Menge von Wachstumsfaktoren bestimmt, beispielsweise G-CSF, der für die Bildung und Ausreifung der Granulozyten zuständig ist. Wenn der eigene Körper zu wenig oder zu viel von diesem Faktor bildet, kann dies auf die Ursache des Mangels der weißen Blutzellen hinweisen. Es werden auch weitere hämatopoetische (blutbildende) Wachstumsfaktoren untersucht, um ihren Einfluss auf die Bildung von Granulozyten festzustellen.

Untergeordnet H-WF	erstellt von	L. Turowski	am 27.03.2015
Version: 1.0	geprüft von	Dr. M. Malaisé	am
Gültig ab 01.04.2015	genehmigt von	Prof. Dr. S. Corbacioglu	am

C:\Users\V3QYCWG\Desktop\etotjenadoskanirovatvsestraniciivsedoki\Patienteninformation und Einwilligung G-CSFAsserviert.docx	Seite 1 von 5
---	---------------



## Anhang 3. Patienteninformation für Eltern/Erziehungsberechtigte. Seite 2.

Universitätsklinikum Regensburg Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation	 Universitätsklinikum Regensburg
<b>Forschungsprojekt hämatopoetische Wachstumsfaktoren bei Neutropenie (H-WF)</b>	

Wir möchten Sie bitten, auf freiwilliger Basis unsere Untersuchungen durch Ihre Einwilligung zu unterstützen, indem Sie uns erlauben die gelagerte Blutprobe Ihres Kindes nun zu Forschungszwecken zu verwenden.

Es ist **nicht** nötig, dass Ihr Kind zu zusätzlichen Blutentnahmen in die Klinik kommen muss, da nur das bereits bestehende Material verwendet wird. Dadurch entsteht für Ihr Kind keine zusätzliche Belastung, da nur Restmaterial verwendet wird.

Die Daten und Proben Ihres Kindes werden in pseudonymisierter Form (d.h. der Name wird durch eine Kenn-Nummer ersetzt) gelagert, gespeichert und ausgewertet. Zugang zu den Daten Ihres Kindes haben nur Mitarbeiter der Studie. Diese Personen sind zur Verschwiegenheit verpflichtet.

Wenn wir die Blutproben Ihres Kindes in Projekten mit anderen Wissenschaftlern gemeinsam untersuchen oder für Untersuchungen Proben die Klinik verlassen oder wir wissenschaftliche Daten veröffentlichen, die mit den Proben Ihres Kindes gewonnen wurden, wird vor jedem dieser Fälle eine zuverlässige Anonymisierung erfolgen.

**Das bedeutet, dass niemand den Namen oder persönliche Daten Ihres Kindes herausfinden oder zu den Proben zuordnen kann.**

Die personenbezogenen Daten werden nach Erreichen des Studienziels/Ende des Forschungsvorhabens, spätestens jedoch nach 30 Jahren gelöscht, soweit gesetzliche Vorgaben nicht längere Archivierungspflichten vorsehen. Wenn Sie von der Studie zurücktreten, werden keine weiteren Daten von Ihrem Kind erhoben. Bereits erfasste Daten werden gelöscht, die Proben Ihres Kindes vernichtet.


Durch die Studienteilnahme entstehen Ihnen keine zusätzlichen Kosten.

Ob Sie mit der Verwendung der Blutprobe für die beschriebenen wissenschaftlichen Zwecke einverstanden sind oder nicht, wird die weitere Behandlung Ihres Kindes selbstverständlich nicht beeinflussen. Darüber hinaus können Sie jederzeit auch ohne Angaben von Gründen die Studienteilnahme beenden, ohne dass Ihrem Kind dadurch Nachteile im Hinblick auf die medizinische Behandlung oder das Verhältnis zu dem behandelnden Arzt entstehen.

Wir bitten Sie, im Falle Ihrer Zustimmung die unterschriebene Einwilligungserklärung in dem mitgesendeten freigemachten Brief zurückzuschicken. Die Patienteninformation ist nur für Sie bestimmt, deshalb können Sie sie behalten. Die Kopie der Einwilligungserklärung ist ebenfalls für Ihre Unterlagen bestimmt.

Untergeordnet H-WF	erstellt von	L. Turowski	am 27.03.2015
Version: 1.0	geprüft von	Dr. M. Malaisé	am
Gültig ab 01.04.2015	genehmigt von	Prof. Dr. S. Corbacioglu	am
C:\Users\I3QYCWG\Desktop\pletotojenadoskanirovatvsestraniciivsedokil\Patienteninformation und Einwilligung G-CSFAsserviert.docx			Seite 2 von 5

### Anhang 3. Patienteninformation für Eltern/Erziehungsberechtigte. Seite 3.

Universitätsklinikum Regensburg Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation	 Universitätsklinikum Regensburg
<b>Forschungsprojekt hämatopoetische Wachstumsfaktoren bei Neutropenie (H-WF)</b>	


Sollten Sie weitere Fragen bezüglich der Studie haben, können Sie unter der Telefonnummer 0941/944-2101 einen Arzt der Studie sprechen. Weitere Kontaktmöglichkeiten für Sie sind:

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
 Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation  
 Universitätsklinikum Regensburg  
 Franz-Josef-Strauß-Allee 11  
 93053 Regensburg  
 Telefax: 0941 944-2102  
 E-Mail: [cornelia.aulinger@ukr.de](mailto:cornelia.aulinger@ukr.de)  
 Internet: <http://www.ukr.de>

In der Einwilligungserklärung müssen beide Elternteil/Erziehungsberechtigte unterschreiben und damit ihre Zustimmung zur Studienteilnahme geben. Bitte kreuzen Sie in der Einwilligungserklärung an, ob die Daten Ihres Kindes in pseudonymisierter Form oder anonymisiert gespeichert werden sollen.

Untergeordnet H-WF	erstellt von	L. Turowski	am 27.03.2015
Version: 1.0	geprüft von	Dr. M. Malaisé	am
Gültig ab 01.04.2015	genehmigt von	Prof. Dr. S. Corbacioglu	am
C:\Users\13QYCWG\Desktop\letotjenadoskanirovatvsestranicivsedoki\Patienteninformation und Einwilligung G-CSFAsserviert.docx			Seite 3 von 5

## Anhang 4. Patienteninformation für Jugendliche. Seite 1.

Universitätsklinikum Regensburg Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation	 Universitätsklinikum Regensburg
<b>Forschungsprojekt hämatopoetische Wachstumsfaktoren bei Neutropenie (H-WF)</b>	

Original für Patienten

### Patienteninformation für Jugendliche

**Patientendaten:** (Patientenetikett)

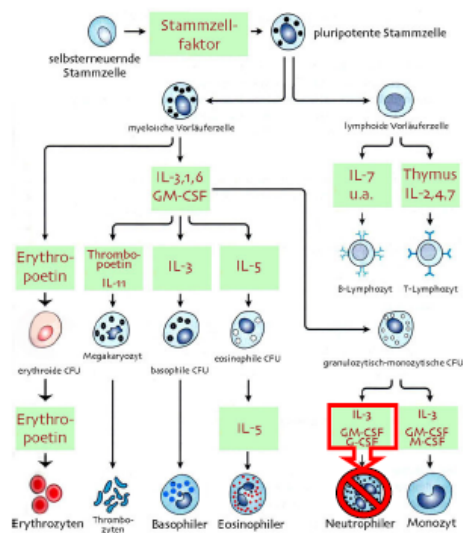
Name: \_\_\_\_\_

Vorname: \_\_\_\_\_

Geburtsdatum: \_\_\_\_\_ Geschlecht:  weibl. |  männl.

Liebe/r Patient/in,

bei dir wurde ein Mangel an einer bestimmten Sorte von weißen Blutkörperchen (Granulozyten) festgestellt. Wissenschaftler in unserem Institut forschen daran, mögliche Gründe für das Auftreten der Krankheit aufzudecken. Falls dies gelingt, können möglicherweise gezieltere Therapieansätze für die Erkrankung gefunden werden. Es ist möglich, dass du durch deine Teilnahme an dieser Studie keinen direkten Nutzen für deine Gesundheit haben wirst. Die Ergebnisse dieser Studie sollen jedoch dazu beitragen, dass für andere Patienten mit derselben Erkrankung eine neue Behandlung gefunden wird.




Konkret wird in dieser Studie die im Blut vorhandene Menge von Wachstumsfaktoren bestimmt, beispielsweise G-CSF, der für die Bildung und Ausreifung der Granulozyten zuständig ist. Wenn der eigene Körper zu wenig oder zu viel von diesem Faktor bildet, kann dies auf die Ursache des Mangels der weißen Blutzellen hinweisen. Es werden auch weitere hämatopoetische (blutbildende) Wachstumsfaktoren untersucht, um ihren Einfluss auf die Bildung von Granulozyten festzustellen.

Wir möchten dich bitten, auf freiwilliger Basis unsere Untersuchungen durch deine Einwilligung zu unterstützen, indem du uns erlaubst bei medizinisch notwendigen Blutentnahmen übriges Material von dir, das nicht mehr für die Diagnosestellung oder die Verlaufskontrolle verwendet wird, für Forschungszwecke zu verwenden und einzufrieren.

Untergeordnet H-WF	erstellt von	L. Turowski	am 27.03.2015
Version: 1.0	geprüft von	Dr. M. Malaisé	am
Gültig ab 01.04.2015	genehmigt von	Prof. Dr. S. Corbacioglu	am

C:\Users\I3QYCWG\Desktop\etojenadoskanirovatvsestraniciivsedoki\Patienteninformation und Einwilligung G-CSFJugendliche.docx	Seite 1 von 4
---	---------------

## Anhang 4. Patienteninformation für Jugendliche. Seite 2.

Universitätsklinikum Regensburg Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation	 Universitätsklinikum Regensburg
<b>Forschungsprojekt hämatopoetische Wachstumsfaktoren bei Neutropenie (H-WF)</b>	

Dadurch entsteht für dich keine zusätzliche Belastung, da nur Restmaterial verwendet wird.

Deine Daten und Proben werden in pseudonymisierter Form (d.h. der Name wird durch eine Kenn-Nummer ersetzt) gelagert, gespeichert und ausgewertet. Zugang zu den Daten haben nur Mitarbeiter der Studie. Diese Personen sind zur Verschwiegenheit verpflichtet. Wenn wir die deine Blutproben in Projekten mit anderen Wissenschaftlern gemeinsam untersuchen oder für Untersuchungen Proben die Klinik verlassen oder wir wissenschaftliche Daten veröffentlichen, die mit deinen Proben gewonnen wurden, wird vor jedem dieser Fälle eine zuverlässige Anonymisierung erfolgen.

**Das bedeutet, dass niemand deinen Namen oder persönliche Daten herausfinden oder zu deinen Proben zuordnen kann.**

Die personenbezogenen Daten werden nach Erreichen des Studienziels/Ende des Forschungsvorhabens, spätestens jedoch nach 30 Jahren gelöscht, soweit gesetzliche Vorgaben nicht längere Archivierungspflichten vorsehen. Wenn du von der Studie zurücktrittst, werden keine weiteren Daten von dir erhoben. Bereits erfasste Daten werden gelöscht, die Proben vernichtet.

Durch die Studienteilnahme entstehen dir keine zusätzlichen Kosten.

Ob du mit der Verwendung der Blutprobe für die beschriebenen wissenschaftlichen Zwecke einverstanden bist oder nicht, wird deine weitere Behandlung selbstverständlich nicht beeinflussen. Darüber hinaus kannst du jederzeit auch ohne Angaben von Gründen die Studienteilnahme beenden, ohne dass dir dadurch Nachteile im Hinblick auf die medizinische Behandlung oder das Verhältnis zu deinem behandelnden Arzt entstehen.


Solltest du weitere Fragen bezüglich der Studie haben, wende dich bitte an den aufklärenden Arzt.

Solltest du später weitere Fragen bezüglich der Studie haben, kannst du unter der Telefonnummer 0941/944-2101 einen Arzt der Studie sprechen. Weitere Kontaktmöglichkeiten für dich sind:

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
 Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation  
 Universitätsklinikum Regensburg  
 Franz-Josef-Strauß-Allee 11  
 93053 Regensburg  
 Telefax: 0941 944-2102  
 E-Mail: [comelia.aulinger@ukr.de](mailto:comelia.aulinger@ukr.de)  
 Internet: <http://www.ukr.de>

Untergeordnet H-WF	erstellt von	L. Turowski	am 27.03.2015
Version: 1.0	geprüft von	Dr. M. Malaisé	am
Gültig ab 01.04.2015	genehmigt von	Prof. Dr. S. Corbacioglu	am
C:\Users\I3QYCWG\Desktop\pletotojenadoskanirovatvsestraniciivsedoki\Patienteninformation und Einwilligung G-CSFJugendliche.docx			Seite 2 von 4

## Anhang 5. Einwilligungserklärung für Eltern/ Erziehungsberechtigte Kontrollgruppe. Seite 1

Universitätsklinikum Regensburg Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation	 Universitätsklinikum Regensburg
<b>Forschungsprojekt hämatopoetische Wachstumsfaktoren bei Neutropenie (H-WF)</b>	

Original für Prüfarzt  
 Kopie für Patienten  
 Kopie für Patientenakte

### Einwilligungserklärung für Eltern/Erziehungsberechtigte

**Patientendaten:** (Patientenetikett)

Name:	
Vorname:	
Geburtsdatum:	Geschlecht: <input type="checkbox"/> weibl.   <input type="checkbox"/> männl.

.....  
 Name, Vorname, Geburtsdatum des Erziehungsberechtigten

.....  
 Name, Vorname, Geburtsdatum des Erziehungsberechtigten

Wir haben die schriftliche Patienteninformation zum oben genannten Forschungsvorhaben erhalten. Uns wurde eine Kopie unserer unterschriebenen Einwilligungserklärung ausgehändigt. Wir haben beide Dokumente gelesen und verstanden. Wir wurden schriftlich und mündlich über das Ziel der Studie, unsere Rechte und Pflichten und die Freiwilligkeit der Teilnahme aufgeklärt.


Wir sind mit der Erhebung, Speicherung und Übermittlung von Angaben über die Gesundheit unseres Kindes im Rahmen des Forschungsvorhabens einverstanden.

Wir wurden über die Datenschutzrechte unseres Kindes informiert.

Wir hatten Gelegenheit Fragen zu stellen. Diese wurden zufrieden stellend und vollständig beantwortet. Zusätzlich zu der schriftlichen Information wurden folgende Punkte besprochen:

Untergeordnet H-WF	erstellt von	L. Turowski	am 27.03.2015
Version: 1.0	geprüft von	Dr. M. Malaisé	am
Gültig ab 01.04.2015	genehmigt von	Prof. Dr. S. Corbacioglu	am
C:\Users\I3QYCWG\Desktop\etojenadoskanirovatvsestraniciivsedoki\Patienteninformation und Einwilligung G-CSFKontrollgruppe.docx			Seite 4 von 4

## Anhang 5. Einwilligungserklärung für Eltern/ Erziehungsberechtigte Kontrollgruppe. Seite 2.

Universitätsklinikum Regensburg Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation	 Universitätsklinikum Regensburg
<b>Forschungsprojekt hämatopoetische Wachstumsfaktoren bei Neutropenie (H-WF)</b>	

Wir erklären hiermit die Teilnahme unseres Kindes an dem oben genannten Forschungsvorhaben. Wir wurden darauf hingewiesen, dass die Teilnahme an der Studie freiwillig ist und dass wir das Recht haben, diese jederzeit ohne Angabe von Gründen zu beenden, ohne dass unser Kind dadurch Nachteile entstehen.

- Wir willigen in die Lagerung, Speicherung und Auswertung der Proben unseres Kindes in pseudonymisierter Form ein.
- Wir willigen in die Lagerung, Speicherung und Auswertung der Proben unseres Kindes in anonymisierter Form ein.

.....

Ort, Datum    Unterschrift des Erziehungsberechtigten

.....

Ort, Datum    Unterschrift des Erziehungsberechtigten

Erklärung des aufklärenden Arztes:

Hiermit erkläre ich, dass ich die Eltern/Erziehungsberechtigten des/r oben genannten Teilnehmers/in am ..... über Wesen, Bedeutung und Tragweite und Risiken der oben genannten wissenschaftlichen Vorhaben mündlich und schriftlich aufgeklärt habe und Ihnen eine Ausfertigung der Einwilligungserklärung übergeben habe.

.....


Ort, Datum    Unterschrift des/r aufklärenden Arztes/Ärztin

Untergeordnet H-WF	erstellt von	L. Turowski	am 27.03.2015
Version: 1.0	geprüft von	Dr. M. Malaisé	am
Gültig ab 01.04.2015	genehmigt von	Prof. Dr. S. Corbacioglu	am

C:\Users\I3QYCWG\Desktop\tojetojenadoskanirovatvsestraniciivsedokilPatienteninformation und Einwilligung G-CSFKontrollgruppe.docx	Seite 5 von 5
---	---------------



## Anhang 6. Einwilligungserklärung für Jugendliche Kontrollgruppe. Seite 1.

Universitätsklinikum Regensburg Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation	 Universitätsklinikum Regensburg
<b>Forschungsprojekt hämatopoetische Wachstumsfaktoren bei Neutropenie (H-WF)</b>	

Original für Prüfarzt  
 Kopie für Patienten  
 Kopie für Patientenakte

### Einwilligungserklärung für Jugendliche

**Patientendaten:** (Patientenetikett)

Name:	
Vorname:	
Geburtsdatum:	Geschlecht: <input type="checkbox"/> weibl.   <input type="checkbox"/> männl.

Ich habe die schriftliche Patienteninformation zum oben genannten Forschungsvorhaben erhalten. Mir wurde eine Kopie meiner unterschriebenen Einwilligungserklärung ausgehändigt. Ich habe beide Dokumente gelesen und verstanden. Ich wurde schriftlich und mündlich über das Ziel der Studie, meine Rechte und Pflichten und die Freiwilligkeit der Teilnahme aufgeklärt.


Ich bin mit der Erhebung, Speicherung und Übermittlung von Angaben über meine Gesundheit im Rahmen des Forschungsvorhabens einverstanden.

Ich wurde über die Datenschutzrechte informiert.

Ich hatte Gelegenheit Fragen zu stellen. Diese wurden zufrieden stellend und vollständig beantwortet. Zusätzlich zu der schriftlichen Information wurden folgende Punkte besprochen:

Untergeordnet H-WF	erstellt von	L. Turowski	am 27.03.2015
Version: 1.0	geprüft von	Dr. M. Malaisé	am
Gültig ab 01.04.2015	genehmigt von	Prof. Dr. S. Corbacioglu	am
C:\Users\13QYCWG\Desktop\tojenadoskanirovatvsestranici\sedokil\Patienteninformation und Einwilligung G-CSFKontrollgruppe Jugendliche.docx			Seite 3 von 4

## Anhang 6. Einwilligungserklärung für Jugendliche Kontrollgruppe. Seite 2.

Universitätsklinikum Regensburg Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation	 Universitätsklinikum Regensburg
<b>Forschungsprojekt hämatopoetische Wachstumsfaktoren bei Neutropenie (H-WF)</b>	

Ich erkläre hiermit meine Teilnahme an dem oben genannten Forschungsvorhaben. Ich wurde darauf hingewiesen, dass die Teilnahme an der Studie freiwillig ist und dass ich das Recht habe, diese jederzeit ohne Angabe von Gründen zu beenden, ohne dass mir dadurch Nachteile entstehen.

- Ich willige in die Lagerung, Speicherung und Auswertung meiner Proben in pseudonymisierter Form ein.
- Ich willige in die Lagerung, Speicherung und Auswertung meiner Proben in anonymisierter Form ein.

.....  
 Ort, Datum

Unterschrift des/r Patienten/in

Erklärung des aufklärenden Arztes:

Hiermit erkläre ich, dass ich den/die oben genannte/n Teilnehmer/in am ..... über Wesen, Bedeutung und Tragweite und Risiken der oben genannten wissenschaftlichen Vorhaben mündlich und schriftlich aufgeklärt habe und Ihnen eine Ausfertigung der Einwilligungserklärung übergeben habe.


.....  
 Ort, Datum

Unterschrift des/r aufklärenden Arztes/Ärztin

Untergeordnet H-WF	erstellt von	L. Turowski	am 27.03.2015
Version: 1.0	geprüft von	Dr. M. Malaisé	am
Gültig ab 01.04.2015	genehmigt von	Prof. Dr. S. Corbacioglu	am
C:\Users\I3QYCWG\Desktop\tojetojenadoskanirovatvsestraniciivsedoki\Patienteninformation und Einwilligung G-CSFKontrollgruppe Jugendliche.docx			Seite 4 von 4



# Anhang 7. Patienteninformation für Eltern/Erziehungsberechtigte Kontrollgruppe. Seite 1.

Universitätsklinikum Regensburg Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation	 Universitätsklinikum Regensburg
<b>Forschungsprojekt hämatopoetische Wachstumsfaktoren bei Neutropenie (H-WF)</b>	

Original für Patienten

## Patienteninformation für Eltern/Erziehungsberechtigte

**Patientendaten:** (Patientenetikett)

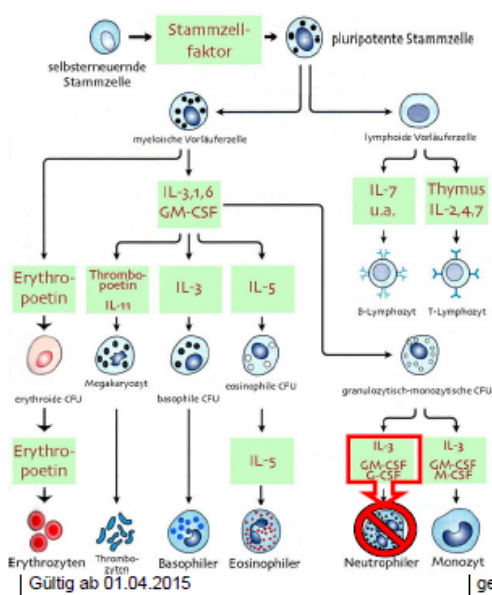
Name: \_\_\_\_\_

Vorname: \_\_\_\_\_

Geburtsdatum: \_\_\_\_\_ Geschlecht:  weibl. |  männl.

Sehr geehrte/r Eltern/Erziehungsberechtigte/r,

bei Ihrem Kind wurde eine Blutuntersuchung vorgenommen. Wissenschaftler in unserem Institut forschen daran, mögliche Gründe für das Auftreten einer Krankheit aufzudecken, bei der ein Mangel an einer bestimmten Sorte von weißen Blutkörperchen (Granulozyten) auftritt. Falls dies gelingt, können möglicherweise gezieltere Therapieansätze für die Erkrankung gefunden werden. Die Probe Ihres Kindes würde zur Ermittlung der Referenzwerte (das heißt Werte von Kindern ohne diese Erkrankung zum Vergleich) verwendet werden. Es ist möglich, dass Ihr Kind durch seine Teilnahme an dieser Studie keinen direkten Nutzen für seine Gesundheit haben wird. Die Ergebnisse dieser Studie sollen jedoch dazu beitragen, dass für Patienten mit dieser Erkrankung eine neue Behandlung gefunden wird.




Konkret wird in dieser Studie die im Blut vorhandene Menge von Wachstumsfaktoren bestimmt, beispielsweise G-CSF, der für die Bildung und Ausreifung der Granulozyten zuständig ist. Wenn der eigene Körper zu wenig oder zu viel von diesem Faktor bildet, kann dies auf die Ursache des Mangels der weißen Blutzellen hinweisen. Es werden auch weitere hämatopoetische (blutbildende) Wachstumsfaktoren untersucht, um ihren Einfluss auf die Bildung von Granulozyten festzustellen.

Wir möchten Sie bitten, auf freiwilliger Basis unsere Untersuchungen durch Ihre Einwilligung zu unterstützen, indem Sie uns erlauben bei medizinisch notwendigen Blutentnahmen Ihres Kindes übrig gebliebenes Material, das nicht mehr für Diagnose-

stellt von	L. Turowski	am 27.03.2015
prüft von	Dr. M. Malaisé	am
genehmigt von	Prof. Dr. S. Corbacioglu	am

## Anhang 7. Patienteninformation für Eltern/Erziehungsberechtigte Kontrollgruppe. Seite 2.

Universitätsklinikum Regensburg Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation	 Universitätsklinikum Regensburg
<b>Forschungsprojekt hämatopoetische Wachstumsfaktoren bei Neutropenie (H-WF)</b>	

stellung oder Verlaufskontrolle verwendet wird, für Forschungszwecke einzufrieren und zu verwenden.

Dadurch entsteht für Ihr Kind keine zusätzliche Belastung, da nur Restmaterial verwendet wird.

Die Daten und Proben Ihres Kindes werden in pseudonymisierter Form (d.h. der Name wird durch eine Kenn-Nummer ersetzt) gelagert, gespeichert und ausgewertet. Zugang zu den Daten Ihres Kindes haben nur Mitarbeiter der Studie. Diese Personen sind zur Verschwiegenheit verpflichtet. Wenn wir die Blutproben Ihres Kindes in Projekten mit anderen Wissenschaftlern gemeinsam untersuchen oder für Untersuchungen Proben die Klinik verlassen oder wir wissenschaftliche Daten veröffentlichen, die mit den Proben Ihres Kindes gewonnen wurden, wird vor jedem dieser Fälle eine zuverlässige Anonymisierung erfolgen.

**Das bedeutet, dass niemand den Namen oder persönliche Daten Ihres Kindes herausfinden oder zu den Proben zuordnen kann.**

Die personenbezogenen Daten werden nach Erreichen des Studienziels/Ende des Forschungsvorhabens, spätestens jedoch nach 30 Jahren gelöscht, soweit gesetzliche Vorgaben nicht längere Archivierungspflichten vorsehen. Wenn Sie von der Studie zurücktreten, werden keine weiteren Daten von Ihrem Kind erhoben. Bereits erfasste Daten werden gelöscht, die Proben Ihres Kindes vernichtet.

Durch die Studienteilnahme entstehen Ihnen keine zusätzlichen Kosten.

Ob Sie mit der Verwendung der Blutprobe für die beschriebenen wissenschaftlichen Zwecke einverstanden sind oder nicht, wird die weitere Behandlung Ihres Kindes selbstverständlich nicht beeinflussen. Darüber hinaus können Sie jederzeit auch ohne Angaben von Gründen die Studienteilnahme beenden, ohne dass Ihrem Kind dadurch Nachteile im Hinblick auf die medizinische Behandlung oder das Verhältnis zu dem behandelnden Arzt entstehen.


Sollten Sie weitere Fragen bezüglich der Studie haben, wenden Sie sich bitte an den aufklärenden Arzt.

Sollten Sie später weitere Fragen bezüglich der Studie haben, können Sie unter der Telefonnummer 0941/944-2101 einen Arzt der Studie sprechen. Weitere Kontaktmöglichkeiten für Sie sind:

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
 Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation  
 Universitätsklinikum Regensburg  
 Franz-Josef-Strauß-Allee 11  
 93053 Regensburg

Untergeordnet H-WF	erstellt von	L. Turowski	am 27.03.2015
Version: 1.0	geprüft von	Dr. M. Malaisé	am
Gültig ab 01.04.2015	genehmigt von	Prof. Dr. S. Corbacioglu	am
C:\Users\I3QYCWG\Desktop\etotjenadoskanirovatvsestraniciivsedoki\Patienteninformation und Einwilligung G-CSFKontrollgruppe.docx			Seite 2 von 4


**Anhang 7. Patienteninformation für Eltern/Erziehungsberechtigte  
Kontrollgruppe. Seite 3.**

Universitätsklinikum Regensburg Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation	 Universitätsklinikum Regensburg
<p style="text-align: center;"><b>Forschungsprojekt hämatopoetische Wachstumsfaktoren bei Neutropenie (H-WF)</b></p>	

Telefax: 0941 944-2102  
 E-Mail: [cornelia.aulinger@ukr.de](mailto:cornelia.aulinger@ukr.de)  
 Internet: <http://www.ukr.de>

Untergeordnet H-WF	erstellt von	L. Turowski	am 27.03.2015
Version: 1.0	geprüft von	Dr. M. Malaisé	am
Gültig ab 01.04.2015	genehmigt von	Prof. Dr. S. Corbacioglu	am
C:\Users\I3QYCWG\Desktop\letotojenadoskanirovatvsestraniciivsedoki\Patienteninformation und Einwilligung G-CSFKontrollgruppe.docx			Seite 3 von 4

# Anhang 8. Patienteninformation für Jugendliche Kontrollgruppe. Seite 1.

Universitätsklinikum Regensburg Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation	 Universitätsklinikum Regensburg
<b>Forschungsprojekt hämatopoetische Wachstumsfaktoren bei Neutropenie (H-WF)</b>	

Original für Patienten

## Patienteninformation für Jugendliche

**Patientendaten:** (Patientenetikett)

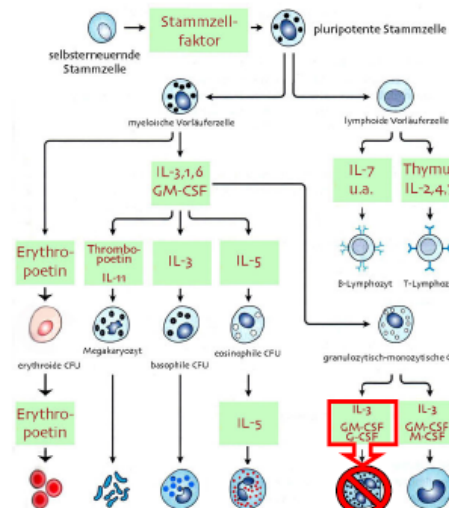
Name: \_\_\_\_\_

Vorname: \_\_\_\_\_

Geburtsdatum: \_\_\_\_\_ Geschlecht:  weibl. |  männl.

Liebe/r Patient/in,

bei dir wurde eine Blutuntersuchung durchgeführt. Wissenschaftler in unserem Institut forschen daran, mögliche Gründe für das Auftreten einer Krankheit aufzudecken, bei der ein Mangel an einer bestimmten Sorte von weißen Blutkörperchen (Granulozyten) auftritt. Falls dies gelingt, können möglicherweise gezieltere Therapieansätze für die Erkrankung gefunden werden. Deine Probe würde zur Ermittlung der Referenzwerte (das heißt Werte von Patienten ohne diese Erkrankung zum Vergleich) verwendet werden. Es ist möglich, dass du durch deine Teilnahme an dieser Studie keinen direkten Nutzen für deine Gesundheit haben wirst. Die Ergebnisse dieser Studie sollen jedoch dazu beitragen, dass für Patienten mit dieser Erkrankung eine neue Behandlung gefunden wird.




Konkret wird in dieser Studie die im Blut vorhandene Menge von Wachstumsfaktoren bestimmt, beispielsweise G-CSF, der für die Bildung und Ausreifung der Granulozyten zuständig ist. Wenn der eigene Körper zu wenig oder zu viel von diesem Faktor bildet, kann dies auf die Ursache des Mangels der weißen Blutzellen hinweisen. Es werden auch weitere hämatopoetische (blutbildende) Wachstumsfaktoren untersucht, um ihren Einfluss auf die Bildung von Granulozyten festzustellen.

Wir möchten dich bitten, auf freiwilliger Basis unsere Untersuchungen durch deine Einwilligung zu unterstützen, indem du uns erlaubst bei medizinisch notwendigen Blutentnahmen übriges Material von dir, das nicht mehr für die Diagnosestellung

Version: 1.0	geprüft von	L. Turowski	am 27.03.2015
Gültig ab 01.04.2015	genehmigt von	Dr. M. Malaisé	am
		Prof. Dr. S. Corbacioglu	am

C:\Users\13QYCWG\Desktop\etojenadoskanirovatvsestraniciivsedoki\Patienteninformation und Einwilligung G-CSFKontrollgruppe Jugendliche.docx	Seite 1 von 4
--	---------------

## Anhang 8. Patienteninformation für Jugendliche Kontrollgruppe. Seite 2.

Universitätsklinikum Regensburg Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation	 Universitätsklinikum Regensburg
<b>Forschungsprojekt hämatopoetische Wachstumsfaktoren bei Neutropenie (H-WF)</b>	

oder die Verlaufskontrolle verwendet wird, für Forschungszwecke zu verwenden und einzufrieren.

Dadurch entsteht für dich keine zusätzliche Belastung, da nur Restmaterial verwendet wird.

Deine Daten und Proben werden in pseudonymisierter Form (d.h. der Name wird durch eine Kenn-Nummer ersetzt) gelagert, gespeichert und ausgewertet. Zugang zu den Daten haben nur Mitarbeiter der Studie. Diese Personen sind zur Verschwiegenheit verpflichtet. Wenn wir die deine Blutproben in Projekten mit anderen Wissenschaftlern gemeinsam untersuchen oder für Untersuchungen Proben die Klinik verlassen oder wir wissenschaftliche Daten veröffentlichen, die mit deinen Proben gewonnen wurden, wird vor jedem dieser Fälle eine zuverlässige Anonymisierung erfolgen.

**Das bedeutet, dass niemand deinen Namen oder persönliche Daten herausfinden oder zu deinen Proben zuordnen kann.**

Die personenbezogenen Daten werden nach Erreichen des Studienziels/Ende des Forschungsvorhabens, spätestens jedoch nach 30 Jahren gelöscht, soweit gesetzliche Vorgaben nicht längere Archivierungspflichten vorsehen. Wenn du von der Studie zurücktrittst, werden keine weiteren Daten von dir erhoben. Bereits erfasste Daten werden gelöscht, die Proben vernichtet.

Durch die Studienteilnahme entstehen dir keine zusätzlichen Kosten.

Ob du mit der Verwendung der Blutprobe für die beschriebenen wissenschaftlichen Zwecke einverstanden bist oder nicht, wird deine weitere Behandlung selbstverständlich nicht beeinflussen. Darüber hinaus kannst du jederzeit auch ohne Angaben von Gründen die Studienteilnahme beenden, ohne dass dir dadurch Nachteile im Hinblick auf die medizinische Behandlung oder das Verhältnis zu deinem behandelnden Arzt entstehen.

Solltest du weitere Fragen bezüglich der Studie haben, wende dich bitte an den aufklärenden Arzt.

Solltest du später weitere Fragen bezüglich der Studie haben, kannst du unter der Telefonnummer 0941/944-2101 einen Arzt der Studie sprechen. Weitere Kontaktmöglichkeiten für dich sind:


Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
 Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation  
 Universitätsklinikum Regensburg  
 Franz-Josef-Strauß-Allee 11  
 93053 Regensburg  
 Telefax: 0941 944-2102  
 E-Mail: [cornelia.aulinger@ukr.de](mailto:cornelia.aulinger@ukr.de)  
 Internet: <http://www.ukr.de>

Untergeordnet H-WF	erstellt von	L. Turowski	am 27.03.2015
Version: 1.0	geprüft von	Dr. M. Malaisé	am
Gültig ab 01.04.2015	genehmigt von	Prof. Dr. S. Corbacioglu	am

C:\Users\I3QYCWG\Desktop\etojenadoskanirovatvsestraniciivsedokil\Patienteninformation und Einwilligung G-CSFKontrollgruppe Jugendliche.docx	Seite 2 von 4
---	---------------



## Anhang 9. Anforderung an die SPOH-Diagnostik. Seite 1.

Universitätsklinikum Regensburg Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation Studienzentrum pädiatrische Onkologie und Hämatologie (SPOH) – Diagnostik	 Universitätsklinikum Regensburg
<b>Anforderung</b>  an die Forschungsgruppe pädiatrische Onkologie und Hämatologie	Studienzentrum SPOH Raum CS 3.902 Universitätsklinikum Regensburg Franz-Josef-Strauß-Allee 11 93053 Regensburg <a href="mailto:SPOH.Klinik@uni-regensburg.de">SPOH.Klinik@uni-regensburg.de</a> ☎ 0941/944-2066 ☎ 0941/944-2067

### Patientendaten:

Name:
Vorname:
Geburtsdatum:
Geschlecht = <u>weibl.</u>   = <u>männl.</u>
Station:

Anfordernder Arzt: \_\_\_\_\_

Telefon: \_\_\_\_\_

Entnahmedatum: \_\_\_\_\_ Zeit: \_\_\_\_\_

**Klinische Angaben/ Verdachtsdiagnose:**

**Bisherige Therapie/ Therapiestudie:**

G-CSF-Gabe:  nein |  ja am: \_\_\_\_\_

Cortison:  nein |  ja am: \_\_\_\_\_

CRP: \_\_\_\_\_ mg/l | angefordert Klin. Chem.  ja

**Probenannahme im SPOH-Diagnostik ist Montag bis Freitag von 8:00 bis 15:00 Uhr.**

- G-CSF-Spiegel <sup>1)</sup>**

EDTA-Blut	2,7ml
Metrumheparin	8ml
Lithiumheparin	8ml
Stoppaste nativ, abent!	


**Bitte immer Patienteneinwilligung einholen.**

**Probenmaterial mit Anforderungsschein und Patienteneinwilligung im SPOH-Diagnostik abgeben.**

Untergeordnet II. 23 Ant. Formulare für hämatol.-onkol. Diagnostik	erstellt von	P. Turowski	am 30.06.2014
Version: 5.0	geprüft von	U. Hirsch	am 30.06.2014
Gültig ab 30.06.2014	genehmigt von	Prof. Dr. S. Corbacioglu	am 30.06.2014

P:\KLINIK\PAED\Share\SPOH\SPOH_Diagnostik\QMS_SPOH\Qualitätsmanagement\Kapitel\II 23. Formulare\Dateianhang II 23. Formulare\Formulare Word\Anforderungsschein_Forschung_Päd_Onk_Regensburg_5.0.doc	Seite 1 von 2
---	---------------

**Anhang 9. Anforderung an die SPOH-Diagnostik. Seite 2.**

Universitätsklinikum Regensburg Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation Studienzentrum pädiatrische Onkologie und Hämatologie (SPOH) – Diagnostik	 Universitätsklinikum Regensburg
<p><b>Anforderung</b></p> <p>an die          Forschungsgruppe          pädiatrische Onkologie und Hämatologie</p>	

**Wird vom SPOH-Diagnostik ausgefüllt:**

<p><b>G-CSF:</b></p> <p>Patientencode: _____  <small>ID</small></p> <p>Spezimen: <input type="checkbox"/> EDTA-Plasma <input type="checkbox"/> Serum ]</p> <p>Probenvolumen: _____ml</p> <p>Entnahmedatum: _____ Entnahmezzeit: _____</p> <p>Leukozyten: _____/µl Neutrophilie: _____/µl</p> <p>CRP: _____mg/l</p> <p>Einwilligung: <input type="checkbox"/> ja</p>	<p><b>Probekett:</b></p> <p>G-CSF_EDTA-Plasma_P8</p>
---	--

## 9. LITERATURVERZEICHNISS

1. A.V., H., *Grundkurs Hämatologie*. Blackwell Verlag, 2. Auflage 2003, 2003.
2. <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Neutropenie&oldid=155772891>.
3. Retz, M.G., J. , *Medikamentöse Tumorthherapie in der Uroonkologie*. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2010.
4. Audrain, M., et al., *Autoimmune neutropenia in children: analysis of 116 cases*. *Pediatr Allergy Immunol*, 2011. **22**(5): p. 494-6.
5. Bux, J., et al., *Diagnosis and clinical course of autoimmune neutropenia in infancy: analysis of 240 cases*. *Blood*, 1998. **91**(1): p. 181-6.
6. Corbacioglu, S., et al., *Serum granulocyte colony-stimulating factor levels are not increased in patients with autoimmune neutropenia of infancy*. *J Pediatr*, 2000. **137**(1): p. 96-9.
7. [www.msmanuals.com](http://www.msmanuals.com).
8. T. Böhler, H.J.G., G. Horneff, *Neutropenie*.
9. Zeidler, C., B. Schwitzer, and K. Welte, *[Severe congenital neutropenia: trends in diagnosis and therapy]*. *Klin Padiatr*, 2000. **212**(4): p. 145-52.
10. [www.immunodefekt.de/neutropenie.shtml](http://www.immunodefekt.de/neutropenie.shtml).
11. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).
12. Zeidler, C., *[Primary and secondary neutropenia]*. *Z Rheumatol*, 2013. **72**(7): p. 663-8.
13. Lindqvist, H., et al., *Neutropenia in childhood: a 5-year experience at a tertiary center*. *Eur J Pediatr*, 2015. **174**(6): p. 801-7.
14. Nielsen, K.R., et al., *[Primary autoimmune neutropenia in children]*. *Ugeskr Laeger*, 2011. **173**(46): p. 2954-7.
15. [www.kinderblutkrankheiten.de/kontent/erkrankungen](http://www.kinderblutkrankheiten.de/kontent/erkrankungen).
16. [www.wikipedia.de](http://www.wikipedia.de).
17. Bennett, C.L., et al., *Pure red-cell aplasia and epoetin therapy*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(14): p. 1403-8.
18. Engelhardt, M., et al., *High-versus standard-dose filgrastim (rhG-CSF) for mobilization of peripheral-blood progenitor cells from allogeneic donors and CD34(+) immunoselection*. *J Clin Oncol*, 1999. **17**(7): p. 2160-72.
19. JD., G., DeVita VT, Hellmann S., Rosenberg S.A.,(eds) *Cancer*, 5th edn. Lippincott-Raven, Philadelphia New York: p. 2639-2657.
20. <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=G-CSF&oldid=167453917>.
21. Hill, C.P., T.D. Osslund, and D. Eisenberg, *The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(11): p. 5167-71.
22. Majorek, B.M., *Vorbehandlung von Blutspendern mit G-CSF für die präparative Granulozytapherese*. Dissertation, Universität Gießen, 2010.
23. Raso, S.W., et al., *Aggregation of granulocyte-colony stimulating factor in vitro involves a conformationally altered monomeric state*. *Protein Sci*, 2005. **14**(9): p. 2246-57.
24. Engelhardt, M., et al., *Hematopoietic recovery of ex vivo perfusion culture expanded bone marrow and unexpanded peripheral blood progenitors after myeloablative chemotherapy*. *Bone Marrow Transplant*, 2001. **27**(3): p. 249-59.



25. Simmers, R.N., et al., *Localization of the G-CSF gene on chromosome 17 proximal to the breakpoint in the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia*. Blood, 1987. **70**(1): p. 330-2.
26. J., S.T., J Clin Oncol. , 2015
27. Zeitschrift für Chemotherapie, 1994. **letzter Aufruf 1 2010**.
28. Lipp, H.-P., *Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktoren*. Krankenhauspharmazie, 2002. **23** p. 375-383.
29. Bhana, N., *Granulocyte colony-stimulating factors in the management of chemotherapy-induced neutropenia: evidence based review*. Curr Opin Oncol, 2007. **19**(4): p. 328-35.
30. Lehrnbecher, T., *[Hematopoietic growth factors in prophylaxis and therapy of infections complications in children with neutropenia]*. Klin Padiatr, 2001. **213**(4): p. 212-38.
31. Mitchell, P.L., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor in established febrile neutropenia: a randomized study of pediatric patients*. J Clin Oncol, 1997. **15**(3): p. 1163-70.
32. Crea, F., et al., *Pharmacologic rationale for early G-CSF prophylaxis in cancer patients and role of pharmacogenetics in treatment optimization*. Crit Rev Oncol Hematol, 2009. **72**(1): p. 21-44.
33. Lyman, G.H., et al., *Risk of mortality in patients with cancer who experience febrile neutropenia*. Cancer, 2010. **116**(23): p. 5555-63.
34. Aapro, M.S., et al., *2010 update of EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphoproliferative disorders and solid tumours*. Eur J Cancer, 2011. **47**(1): p. 8-32.
35. Schaison, G., et al., *Recommendations on the use of colony-stimulating factors in children: conclusions of a European panel*. Eur J Pediatr, 1998. **157**(12): p. 955-66.
36. Rahiala, J., M. Perkkio, and P. Riikonen, *Prospective and randomized comparison of early versus delayed prophylactic administration of granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) in children with cancer*. Med Pediatr Oncol, 1999. **32**(5): p. 326-30.
37. Michel, G., et al., *Use of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor to increase chemotherapy dose-intensity: a randomized trial in very high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia*. J Clin Oncol, 2000. **18**(7): p. 1517-24.
38. Pui, C.H., et al., *Human granulocyte colony-stimulating factor after induction chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia*. N Engl J Med, 1997. **336**(25): p. 1781-7.
39. Bokemeyer, H.L., 2003 **9**(5): p. 465–472.
40. Ozer, H., et al., *2000 update of recommendations for the use of hematopoietic colony-stimulating factors: evidence-based, clinical practice guidelines. American Society of Clinical Oncology Growth Factors Expert Panel*. J Clin Oncol, 2000. **18**(20): p. 3558-85.
41. Link, H., „Hämatopoetische Wachstumsfaktoren - G-CSF: Prophylaxe der Neutropenie mit G-CSF“. 2001.
42. Karow, L.-R., *Pharmakologie und Toxikologie*. 2008.

43. Fitzhugh, C.D., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) administration in individuals with sickle cell disease: time for a moratorium?* *Cytotherapy*, 2009. **11**(4): p. 464-71.
44. Confer, D.L. and J.P. Miller, *Long-term safety of filgrastim (rhG-CSF) administration.* *Br J Haematol*, 2007. **137**(1): p. 77-8; author reply 79-80.
45. Rote-Hand-Brief von Amgen, 2013.
46. [www.creative-diagnostics.com/ELISA-guide.htm](http://www.creative-diagnostics.com/ELISA-guide.htm).
47. [www.amboss.miamed.de](http://www.amboss.miamed.de).
48. [de.wikipedia.org](http://de.wikipedia.org).
49. <https://matheguru.com/stochastik/t-test.html>.
50. Ikeno, K., *Increased granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) levels in neonates with perinatal complications.* *Acta Paediatr Jpn*, 1994. **36**(4): p. 366-70.
51. Bux, J., C. Hofmann, and K. Welte, *Serum G-CSF levels are not increased in patients with antibody-induced neutropenia unless they are suffering from infectious diseases.* *Br J Haematol*, 1999. **105**(3): p. 616-7.
52. Alexandropoulou, O., et al., *Transient neutropenia in children with febrile illness and associated infectious agents: 2 years' follow-up.* *Eur J Pediatr*, 2013. **172**(6): p. 811-9.
53. Freireich, E.J., et al., *The Function and Fate of Transfused Leukocytes from Donors with Chronic Myelocytic Leukemia in Leukopenic Recipients.* *Ann N Y Acad Sci*, 1964. **113**: p. 1081-9.

## 10. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Erscheinen meiner Dissertation beigetragen haben.

Mein allererster und ganz besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. med. Selim Corbacioglu, für die Vergabe dieser interessanten Dissertationsarbeit und die Möglichkeit der Mitarbeit in tollem Team der Abteilung für PHOS am UKR. Seine sehr fachliche und persönliche Betreuung und verbunden mit viel Unterstützung, Engagement und wertvollen Ratschlägen haben die Entstehung dieser Doktorarbeit realisiert.

Mein außerordentlicher Dank geht an meine Betreuerin Dr. rer. nat. Muriel Malaisé. Ich bin sehr dankbar für Ihre Unterstützung, Loyalität, Betreuung und da sein, wann immer und wo immer ich ihre Hilfe brauchte. Dank Ihr habe ich vieles gelernt: das richtige Arbeiten im Labor, ELISA-Durchführung, Bearbeitung der Ergebnisse in Tabellen, Word, Excel und GraphPad Prism - Programm. Dank Ihrem Wissen wurde es möglich diese Doktorarbeit in Form und Struktur zu bringen.

Mein Dank geht an das gesamte Team von Prof. Dr. med. Selim Corbacioglu: Ärztlicher Dienst PD Dr.med. Jürgen Föll, Dr. med. Marcus Jakob, Maite Gorostegui, Dr. med. Klaus Rehe, Sekretariat und das gesamte Pflegedienst, die es ermöglicht haben die Patientendaten zu bearbeiten und deren Proben zu gewinnen. Besonderen Dank will ich an das Labor-Team (SPOH-Diagnostik) äußern, dass mich bei der Bearbeitung der Patientenproben stets geholfen hat: Petra Turowski, Ursula Hirsch, Marie Matthes, Karin Wein und Susanne Heyn. Sie haben damit einen entscheidenden Beitrag zu gelingen dieser Doktorarbeit geleistet.

Ohne Unterstützung meiner Familie und Freunden hätte ich es nicht geschafft. Ich will mich ganz herzlich bei meinem Mann, meinem Sohn und meinen Eltern für die „24-Stunden, 360° Grad“ Unterstützung, Liebe und Geduld ganz herzlich bedanken. Sie haben mir es ermöglicht diese Doktorarbeit zu schaffen.