

## In vitro en in vivo effecten van rG-CSF op neutrofiële granulocyten

M. de HAAS<sup>1</sup>, J.M. KERST<sup>1</sup>, C.E. van der SCHOOT<sup>1</sup>, D. ROOS<sup>1</sup>, M.H.J. van OERS<sup>1,2</sup> en A.E.G. KR. von dem BORNE<sup>1,2</sup>

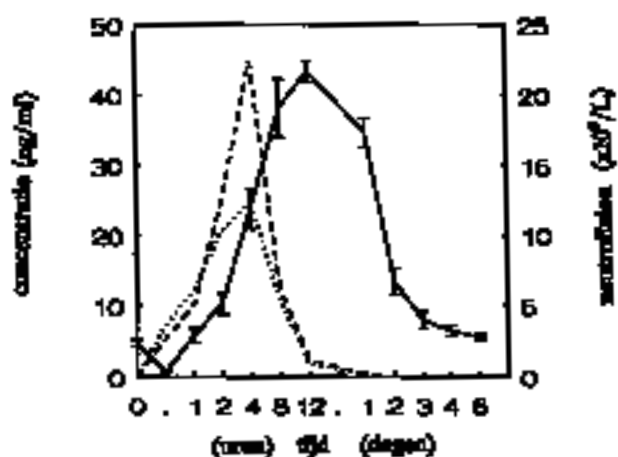
Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) stimuleert de aanmaak van neutrofiële granulocyten en moduleert verscheidene functies van rijpe neutrofielen. In vier vrijwilligers hebben we het effect onderzocht van éénmalig subcutaan toegediend rG-CSF (300 µg) met betrekking tot de expressie en functie van de IgG Fc receptoren (FcγR) van neutrofielen. Alleen de onder invloed van rG-CSF nieuw gevormde neutrofielen brachten FcγRI (CD64) tot expressie en waren in staat tot antistof afhankelijke cellulaire cytotoxiciteit. De expressie van FcγRII (CD32) was niet significant veranderd. De expressie van fosfoinositol verankerd FcγRIII (CD16) vertoonde kortdurend een toename en was sterk verlaagd op de nieuw gevormde neutrofielen. Fosfo-inositol verankerd CD14 en leukocyt alkalische fosfatase vertoonden een toegenomen expressie op deze cellen. De initieel verhoogde FcγRIII expressie was het gevolg van de door rG-CSF geïnduceerde degranulatie van circulerende neutrofielen. Conclusie: rG-CSF toediening induceert de vorming van fenotypisch en functioneel veranderde neutrofiële granulocyten.

Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is een hematopoïetische groeifactor, die specifiek de aanmaak van neutrofiële granulocyten in het beenmerg bevordert en tevens verscheidene functies van rijpe neutrofielen kan beïnvloeden (1). Klinische onderzoeken hebben aangetoond dat toediening van recombinant (r)G-CSF leidt tot een versneld herstel van het aantal circulerende neutrofielen na cytostatische therapie, hetgeen de kans op het optreden van bacteriële infecties vermindert (2-4). Ook bij patiënten met aangeboren neutropenieën kan rG-CSF therapie bijdragen aan een verbeterde neutrofiële afweer. Neutrofiële granulocyten zijn uitgerust met verschillende receptoren, waaronder IgG receptoren, voor het uitvoeren van hun taak: het fagocyteren, doden en vervolgens verteren van het lichaam binnendringende bacteriën. IgG receptoren, of Fcγ receptoren (FcγR), binden de Fc staart van IgG dat aan een bacterie is gebonden. Uit perifeer bloed geïsoleerde neutrofielen brengen FcγRII en FcγRIII tot expressie. Deze beide FcγR binden alleen IgG in complexvorm (gebonden aan antigeen). Gedurende rG-CSF therapie wordt door de neutrofielen ook de monomeer IgG bindende FcγR: FcγRI tot expressie gebracht (5). In experimenten in vitro bleek rG-CSF niet in staat te zijn FcγRI

expressie te induceren op rijpe neutrofielen geïsoleerd uit perifeer bloed (6). Echter, indien myeloïde voorlopercellen onder invloed van rG-CSF in vitro tot differentiatie werden gebracht, resulteerde dit in de vorming van FcγRI positieve, morfologisch rijpe neutrofiële granulocyten (7). Analyse van FcγR expressie door granulocyttaire voorlopercellen geïsoleerd uit beenmerg toonde aan dat vanaf het promyelocyt tot metamyelocyt stadium de cellen FcγRI positief waren (7), terwijl een geringe FcγRIII expressie pas waarneembaar was op metamyelocytten. Naar aanleiding van deze observaties onderzochten wij in een recente studie of de onder invloed van rG-CSF in vivo gevormde neutrofiële granulocyten veranderd waren met betrekking tot de expressie en functie van de IgG Fc receptoren en verscheidene andere antigenen (8,9).

### rG-CSF toediening aan gezonde vrijwilligers: onderzoeksprotocol

Een éénmalige, in de kliniek gebruikelijke dosis, van 300 µg rG-CSF (Neupogen, Amgen, Thousand Oaks, CA) werd subcutaan toegediend aan vier gezonde vrijwilligers, na 'informed consent' volgens de regels van het Academisch Medisch Centrum, Amsterdam. Op verschillende tijdstippen voor en na de rG-CSF-injectie werd EDTA-ontstold, veneus bloed afgenomen. Na lysisen van de erythrocyten werd met behulp van flowcytometrische analyse de antigeenexpressie van de neutrofiële granulocyten bepaald. Tevens werd plasma geïsoleerd voor de bepaling van oplosbare antigenen.



**Figuur 1.** Gemiddelde (± SEM) aantal circulerende neutrofielen na subcutane toediening van 300 µg rG-CSF aan vier gezonde vrijwilligers (—). De G-CSF-spiegels gemeten in plasma van twee van de vrijwilligers zijn weergegeven door de onderbroken lijnen.

Centraal Laboratorium van de Bloedtransfusiedienst<sup>1</sup> en Academisch Medisch Centrum<sup>2</sup>, Amsterdam

Correspondentie: M. de Haas, CLB, Afdeling IH-EXP, Plesmanlaan 125, 1066 CX Amsterdam.

## rG-CSF-spiegels en aantallen circulerende neutrofielen

Figuur 1 toont de rG-CSF plasma-spiegels, gemeten in plasma van twee van de vrijwilligers. De endogene, pre-injectie rG-CSF-spiegels waren niet afwijkend. Al na 15 minuten waren 30-voudig verhoogde rG-CSF spiegels detecteerbaar, en de rG-CSF-spiegels bereikten een maximale waarde op 4 uur na injectie (25000 pg/ml en 44000 pg/ml, respectievelijk). 24 uur na rG-CSF-toediening waren geen verhoogde spiegels meer waarneembaar, hetgeen in overeenstemming is met de bekende farmacokinetiek van subcutaan toegediend rG-CSF (10).

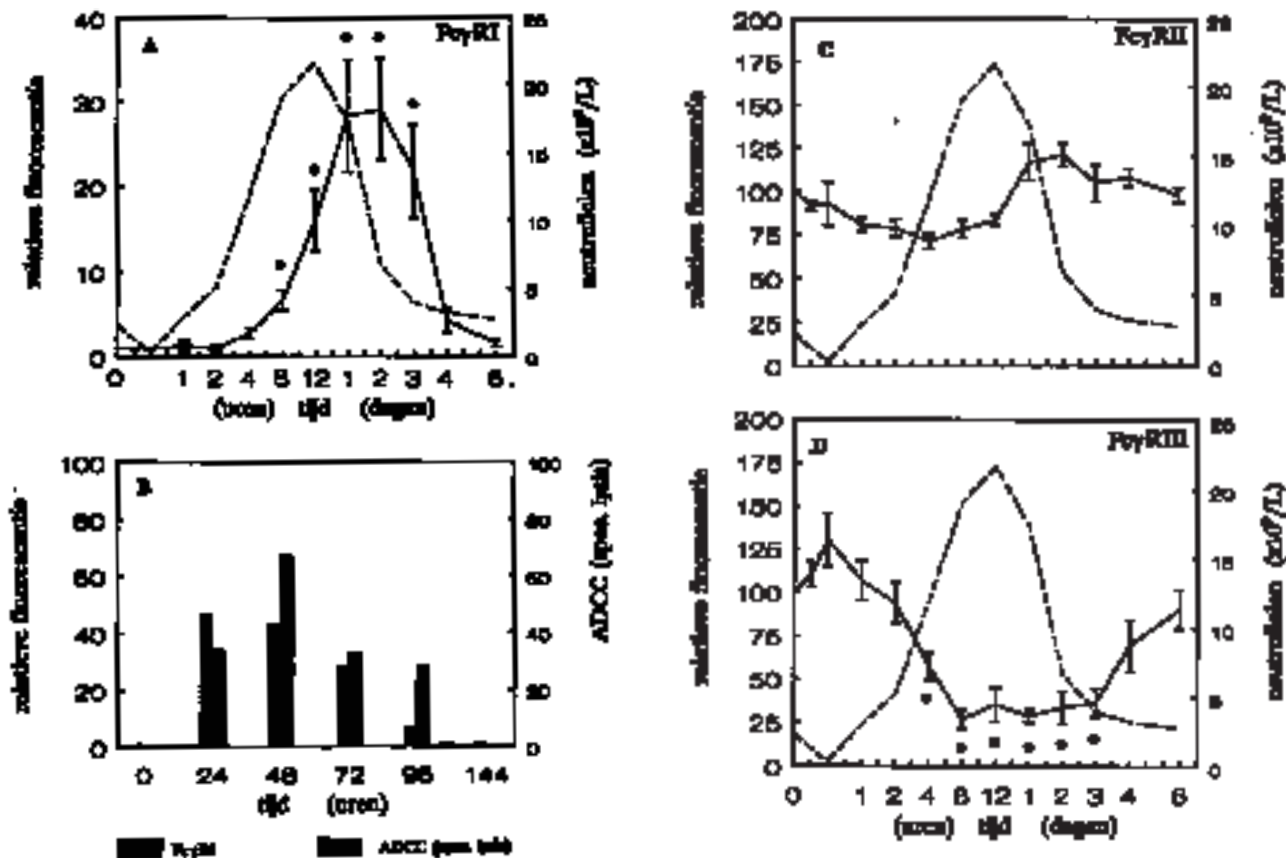
Gedurende het eerste uur na rG-CSF-toediening ontstond er een korte periode van neutropenie met als nadir  $0,38 \times 10^9/l$  circulerende neutrofielen, gemeten op 30 min na injectie (figuur 1). Waarschijnlijk is dit het gevolg van door rG-CSF geïnduceerde activatie van neutrofiel granulocyten, die vervolgens resulteert in het 'vastlopen' van geactiveerde neutrofielen in bijvoorbeeld de pulmonale microvasculatuur. Na deze neutropenische fase was er een snelle toename in aantal circulerende neutrofielen met als piekwaarde op 12 uur na injectie  $21,7 \pm 0,74 \times 10^9/l$ . Tot en met 48 uur na injectie werd een toegenomen aantal neutrofielen in het perifere bloed gemeten. Tussen 4

en 12 uur na injectie werd een geringe linksverschuiving waargenomen met op 12 uur  $1,58 \pm 0,3 \times 10^9/l$  staafkernigen (7,3% van het totaal aantal neutrofielen).

## Expressie van Fcγ-receptoren

Na rG-CSF-toediening verschenen vanaf 8 uur na injectie FcγRI positieve neutrofielen in de circulatie (figuur 2A). Vanaf 24 uur tot en met 72 uur na injectie vertoonden alle circulerende neutrofielen een hoge FcγRI expressie. Aangezien in vitro blootstelling van rijpe neutrofielen aan rG-CSF niet resulteerde in de expressie van FcγRI (6), zou de waargenomen hoge FcγRI-expressie mogelijk verklaard kunnen worden als een effect van rG-CSF op de granulocyttaire voorlopercellen, analoog aan de in vitro granulocyttopoïese (7). Lord et al. hebben aangetoond dat rG-CSF de uitrijpingsfase van neutrofielen in het beenmerg reduceert van 5 dagen naar 1 dag (11). Het lijkt dus aannemelijk dat vanaf 24 uur na rG-CSF-toediening neutrofielen circuleren die versneld uitgerijpt danwel nieuw gevormd en in de circulatie gebracht zijn.

Het functioneren van FcγRI werd getest met behulp van een antistof afhankelijke cellulaire cytotoxiciteits (ADCC) test. In deze test werden Rhesus (Rh)D-positieve erythrocyten met  $^{51}Cr$  gelabeld en vervolgens

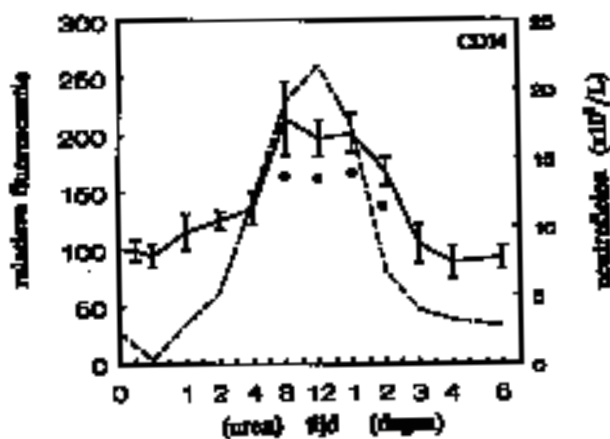


**Figuur 2.** Effect van rG-CSF (300 µg) op de neutrofiel expressie van: (A) FcγRI (CD64, MoAb 32), (C) FcγRII (CD32, MoAb IV.3) en (D) FcγRIII (CD16, MoAb 3G8) (—). De gemiddelde waarden gemeten in vier vrijwilligers zijn weergegeven. Expressie wordt in paneel C en D weergegeven als de relatieve fluorescentie-intensiteit ± SEM; de uitgangswaarde is voor FcγRII en FcγRIII op 100% gesteld. Uitgangswaarde gemiddelde fluorescentie: MoAb 32:  $9 \pm 0,5$  arbitraire eenheden, MoAb IV.3:  $175 \pm 19$  en MoAb 3G8  $843 \pm 141$ . De \* geeft statistisch significante veranderingen weer, berekend via de Student's t-test ( $p < 0,05$ ). In paneel A, C en D wordt het gemiddelde aantal circulerende neutrofielen weergegeven door de stippellijn.

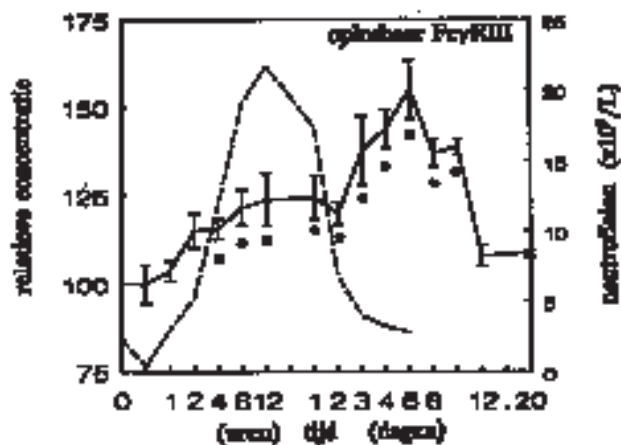
2B: Cellulaire cytotoxiciteit van neutrofiel granulocyten na rG-CSF-toediening aan gezonde vrijwilligers. De representatieve resultaten van één vrijwilliger worden getoond. De lysis van  $^{51}Cr$ -gelabelde RhD-positieve erythrocyten geopsoniseerd met anti-RhD wordt weergegeven als ADCC activiteit. Uitgezet is het percentage specifieke  $^{51}Cr$ -vrijmaking.

geïncubeerd met anti-RhD IgG. Vòòr de toediening van rG-CSF waren de neutrofielen niet in staat de geopsoniseerde erythrocyten te lysisen (figuur 2B). Echter, op die tijdstippen dat de neutrofielen FcγRI tot expressie brachten, werd er wel lysis van de erythrocyten gemeten (figuur 2B). Met behulp van monoklonale antistoffen die specifiek de IgG-binding blokkeerden aan danwel FcγRI, FcγRII of FcγRIII werd aangetoond dat alleen FcγRI blokkerende antistoffen in staat waren deze lysis te voorkòmen. Dit betekent dat inderdaad de hoge- affiniteits IgG-receptor FcγRI verantwoordelijk was voor de waargenomen ADCC activiteit.

De FcγRII-expressie van de neutrofielen veranderde niet significant na rG-CSF-toediening (figuur 2C). Daarentegen werd een kortdurend toegenomen FcγRIII-expressie gemeten tijdens de neutropenische fase (figuur 2D). Blijkbaar resulteerde een door rG-CSF geïnduceerde neutrofiel-activatie in opregulatie van FcγRIII vanuit een intracellulaire voorraad (zie: rG-CSF geïnduceerde neutrofieldegranulatie). Vanaf 1 uur na de rG-CSF-injectie werd een sterke afname in FcγRIII-expressie waargenomen, waarbij de nieuwgevormde neutrofielen nog slechts 30% van de uitgangsexpressie vertoonden (figuur 2D). FcγRIII bezit geen transmembraan en geen cytoplasmatisch domein, maar wordt op het buitenmembraan tot expressie gebracht met behulp van een fosfoinositol (PI) vetzuurketen. De PI-verankerung op zich leek niet verantwoordelijk te zijn voor de afgenomen FcγRIII-expressie op de nieuwgevormde neutrofielen, want andere PI-verankerde eiwitten vertoonden een onveranderde (CD66b antigeen) of toegenomen expressie, zoals het leucocyt alkalische fosfatase en de receptor voor het complex van lipopolysaccharide en lipopolysaccharide-bindend eiwit: CD14 (figuur 3). Aangezien neutrofiel granulocyten FcγRIII van de membraan kunnen afsplitsen, werd het plasmagehalte gemeten van dit afgesplitste, of oplosbare, FcγRIII.



**Figuur 3.** Gemiddelde ( $\pm$  SEM) CD14 expressie van circulerende neutrofielen na subcutane toediening van 300  $\mu$ g rG-CSF aan vier gezonde vrijwilligers (—). De relatieve expressie is uitgezet. De uitgangswaarde van de CD14 expressie was  $37 \pm 4$  arbitraire eenheden (MoAb 8G3). De \* betekent een significante verandering (Student's t-test:  $p < 0,05$ ). De gestippelde lijn geeft het gemiddelde aantal circulerende neutrofielen weer.

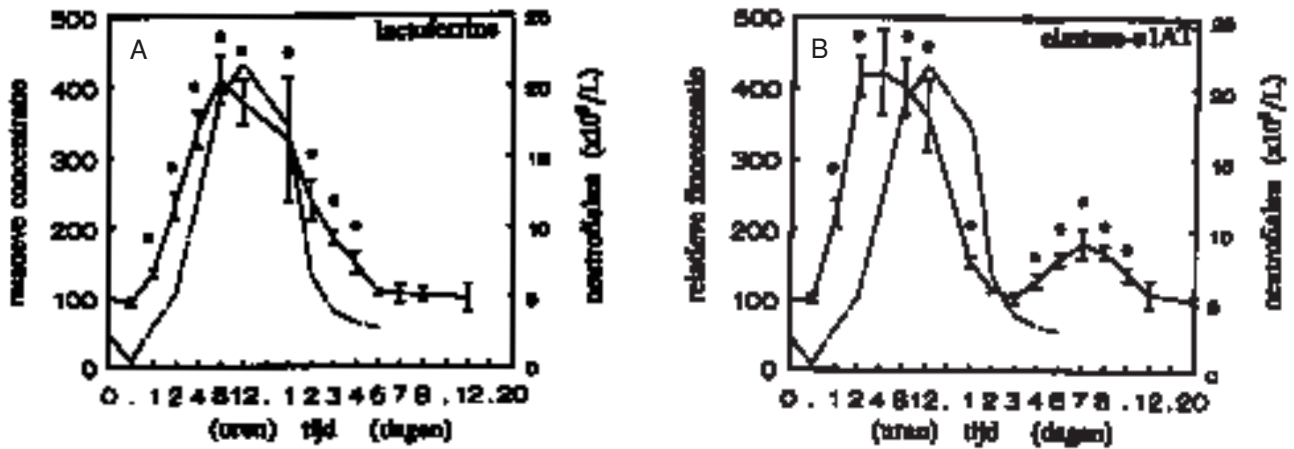


**Figuur 4.** Gemiddelde ( $\pm$  SEM) plasmaconcentratie van oplosbaar FcγRIII na éénmalige subcutane toediening van 300  $\mu$ g rG-CSF aan vier gezonde vrijwilligers (—). De \* betekent een significante verandering (Student's t-test:  $p < 0,05$ ). De gestippelde lijn geeft het gemiddelde aantal circulerende neutrofielen weer.

Zoals figuur 4 laat zien, was er in de eerste uren tot 12 uur na rG-CSF toediening een geringe stijging van de plasmaspiegel van oplosbaar FcγRIII detecteerbaar. Tot en met 48 uur na rG-CSF-toediening bleef de plasmaspiegel van oplosbaar FcγRIII relatief constant, hetgeen in overeenstemming is met de halfwaardetijd van circulerend oplosbaar FcγRIII van 1,5 dag (12). De sterk afgenomen FcγRIII-expressie van de nieuwgevormde neutrofielen leek dus niet het gevolg te zijn van toegenomen afsplitsing van membraan FcγRIII. Een tweede en grotere toename van het oplosbare FcγRIII-gehalte was waarneembaar op die tijdstippen dat het aantal circulerende neutrofielen alweer genormaliseerd was: vanaf 72 uur na rG-CSF-toediening, piekend op dag 6 na de rG-CSF-injectie (figuur 4). Deze stijging van de plasmaspiegel van oplosbaar FcγRIII lijkt het ten gronde gaan van de neutrofielen die naar de weefsels zijn gemigreerd te weerspiegelen. Inderdaad laten recente in vitro experimenten zien dat FcγRIII van de celmembraan wordt afgesplitst tijdens de geprogrammeerde celdood van neutrofiel granulocyten (13). Zoals ook geconcludeerd werd uit eerdere studies (12), lijkt dus het gehalte oplosbaar FcγRIII, met een zekere tijdsvertraging, de vorming van neutrofielen door het beenmerg en daarmee mogelijk de totale lichaams-hoeveelheid aan neutrofiel granulocyten te weerspiegelen.

#### rG-CSF geïnduceerde degranulatie door neutrofielen

Eén van de gevolgen van activatie van neutrofiel granulocyten is de fusie van de verschillende intracellulaire compartimenten met het buitenmembraan van de neutrofiel. Al na geringe activatie worden de zogenaamde "secretory vesicles" gemobiliseerd, terwijl voor de fusie van specifieke of azurofiel granula met de celmembraan een krachtiger stimulus nodig is (14). Gebruik makende van verschillende membraangebonden en oplosbare markeringen van deze drie neutrofiel compartimenten werd de rG-CSF geïnduceerde



**Figuur 5.** Gemiddelde ( $\pm$  SEM) plasmaspiegels van (A) lactoferrine en (B) elastase- $\alpha_1$ -antitrypsine complexen na subcutane toediening van 300  $\mu$ g rG-CSF aan vier gezonde vrijwilligers (—). De relatieve concentratie wordt weergegeven, de uitgangsspiegels zijn op 100% gesteld. Uitgangsplasmaconcentraties bedroegen voor lactoferrine  $93 \pm 11$  ng/ml en voor elastase- $\alpha_1$ -AT  $33 \pm 5$  ng/ml. De gestippelde lijn geeft het gemiddelde aantal circulerende neutrofielen weer.

neutrofiele degranulatie geanalyseerd. Zoals te zien in figuur 2D was kort na rG-CSF-toediening een verhoogde Fc $\gamma$ RIII-expressie op de buitenmembraan van de circulerende neutrofielen waarneembaar. Met behulp van immuno-elektronenmicroscopie werd intracellulair Fc $\gamma$ RIII in membranen van de secretory vesicles gelokaliseerd. Andere membraanmerkers van secretory vesicles zijn CD11b (ook in specifieke granula) en leucocyt alkalische fosfatase (LAF). De circulerende neutrofiele granulocyten lieten tot 4 uur na rG-CSF-toediening een toegenomen CD11b-expressie en een afgenomen activiteit van intracellulair LAF zien. Tevens vertoonden de neutrofiele granulocyten een toegenomen CD66b-expressie (membraanmerker van specifieke granula) en werden viervoudig toegenomen plasmaspiegels van lactoferrine (oplosbare merker van specifieke granula) gemeten (figuur 5a). Er leek dus een intravasculaire mobilisatie van respectievelijk secretory vesicles en specifieke granula waarneembaar in de eerste vier uren na rG-CSF toediening. De slechts kortdurende stijging van de Fc $\gamma$ -RIII-expressie van de circulerende neutrofielen leek

het gevolg te zijn van het gelijktijdig optreden van secretory vesicle mobilisatie en een toegenomen afsplitsing van Fc $\gamma$ RIII, hetgeen weerspiegeld werd in een stijging van het gehalte aan oplosbaar Fc $\gamma$ RIII in plasma (figuur 4). Figuur 5B toont de gemeten toename van de plasmaspiegel van de azurofiele korrelmerker elastase, gemeten in gecomplexeerde vorm met de fysiologische remmer van elastase:  $\alpha_1$ -antitrypsine. Op de circulerende neutrofielen werd echter geen expressie waargenomen van de membraangebonden merker van de azurofiele korrels: CD63. In experimenten in vitro bleek rG-CSF (10 ng/ml) wel de fusie van secretory vesicles en specifieke granula met de celmembraan te induceren, maar er werd geen azurofiele korreldegranulatie waargenomen. Geconcludeerd werd dat de waargenomen mobilisatie van azurofiele korrels mogelijk beruiste op activatie van de neutrofiele granulocyt na het verlaten van de bloedbaan.

Samengevat zijn er vier verschillende fasen te onderscheiden in de effecten van toegediend rG-CSF (tabel 1). Ten eerste is er een onmiddellijk neutrofiel-actieve-

**Tabel 1.** Effecten van rG-CSF-toediening aan gezonde vrijwilligers

	onmiddellijk	vroeg	laat	zeer laat
Tijdstip	30 min-4 uur	8-12 uur	24-72 uur	3-7 dagen
Circulerende neutrofielen	$\downarrow\downarrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow\uparrow$	$\uparrow/N$	N
Degranulatie				
CD11b/CD66b	$\uparrow\uparrow$	N	N	N
lactoferrine	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow$	N	$\uparrow\uparrow$
elastase	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow/N$	N
Fc $\gamma$ R expressie:				
Fc $\gamma$ RI	N	$\uparrow$	$\uparrow\uparrow$	N
Fc $\gamma$ RII	N	N	N	N
Fc $\gamma$ RIII	$\uparrow$	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$	N
LAF activiteit	$\downarrow\downarrow\downarrow$	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow$	N
CD14 expressie	N	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow$	N
Oplosbaar Fc $\gamma$ RIII	N/ $\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow\uparrow$

rend effect van rG-CSF waarneembaar op de circulerende rijpe neutrofielen. Dit leidt tot een kortdurende neutropenie en de mobilisatie van alle intracellulaire compartimenten van de neutrofiel. Tijdens deze en de volgende perioden werden bij de vrijwilligers overigens geen bijwerkingen van het toegediende rG-CSF waargenomen. Een vroeg effect van rG-CSF is vervolgens het uit de beenmergvoorraad vrijmaken van neutrofiële granulocyten. Vanaf 24 uur na injectie zijn, ten gevolge van de invloed van rG-CSF op de myeloïde voorlopercellen, nieuwgevormde neutrofielen in de circulatie waarneembaar: laat effect van rG-CSF. Tenslotte lijkt de toegenomen granulocytopoïese weerspiegeld te worden in toegenomen plasma-spiegels van oplosbaar Fc $\gamma$ RIII en lactoferrine (zeer laat effect).

Concluderend: rG-CSF-toediening leidt tot de vorming van immunofenotypisch en functioneel veranderde neutrofiële granulocyten, die, gezien de expressie van de hoge affiniteitsreceptor voor IgG, Fc $\gamma$ RI, en de toegenomen expressie van de LPS/LBP-receptor, CD14, mogelijk beter bewapend zijn voor de strijd tegen bacteriële infecties.

#### Literatuur

- Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 1991; 78: 2791-2808.
- Gabrilove J. The development of granulocyte colony-stimulating factor in its various clinical applications. *Blood* 1992; 80: 1382-1385.
- Lieschke GJ, Burgess AW. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *N Engl J Med* 1992; 327: 99-106.
- Lieschke GJ, Burgess AW. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *N Engl J Med* 1992; 327: 28-35.
- Repp R, Valerius Th, Sendler A, Gramatzki M, Iro H, Kalden R, Platzer E. Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (FcRI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1991; 78: 885-889.
- Erbe DV, Collins JE, Shen L, Graziano RF, Fanger MW. The effect of cytokines on the expression and function of Fc receptors for IgG on human myeloid cells. *Molecular Immunology* 1990; 27: 57-67.
- Kerst JM, Winkel JGJ van de, Evans AH, Haas M de, Slaper-Cortenbach ICM, Wit PM de, Borne AEG Kr von dem, Schoot CE van der, Oers MHJ van. G-CSF induces hFc $\gamma$ RI (CD64 antigen) positive neutrophils via an effect on myeloid precursor cells. *Blood* 1993; 81: 1457-1464.
- Kerst JM, Haas M de, Schoot CE van der, Slaper-Cortenbach ICM, Kleijer M, Borne AEG Kr von dem, Oers MHJ van. rG-CSF administration to healthy volunteers: Induction of immunophenotypically and functionally altered neutrophils via an effect on myeloid progenitor cells. *Blood* 1993; 82: 3265-3272.
- Haas M de, Kerst JM, Schoot CE van der, Hack CE, Calafat J, Nuijens JH, Roos D, Oers MHJ van, Borne AEG Kr von dem. G-CSF administration to healthy volunteers: Analysis of the immediate activating effects on circulating neutrophils. *Blood* in press, 1994.
- Hollingshead LM, Goa KL. Recombinant Granulocyte Colony-Stimulating Factor (rG-CSF). A review of its pharmacological properties and prospective role in neutropenic conditions. *Drugs* 1991; 42: 300-330.
- Lord BI, Bronchud MH, Owens S, Chang J, Howell A, Souza L, Dexter TM. The kinetics of human granulopoiesis following treatment with granulocyte colony-stimulating factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 9499-9503.
- Huizinga TWJ, Haas M de, Oers MHJ van, Kleijer M, Vile H, Wouw PA van de, Moulijn A, Weezel H van, Roos D, Borne AEG Kr von dem. The plasma concentration of soluble Fc-gamma-RIII is related to production of neutrophils. *Br J Haematol* 1994; 87: 459-463.
- Homburg CHE, Haas M de, Borne AEG Kr von dem, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CPM, Roos D. Expression of FcRIII and phosphatidylserine serve as markers for neutrophil apoptosis. *Blood* 1995; 85: 532.
- Kuijpers TW, Tool ATJ, Schoot CE van der, Ginsel LA, Onderwater JJM, Roos D, Verhoeven AJ. Membrane surface antigen expression on neutrophils: A reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation. *Blood* 1991; 78: 1105-1111.

#### Summary

Haas M de, Kerst JM, Schoot CE van der, Roos D, Oers MHJ van, Borne AEG Kr von dem. *In vitro* and *in vivo* effects of rG-CSF on neutrophils. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1995; 20: 82-86. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) stimulates the production of neutrophils and modulates several functions of mature neutrophils. In four healthy volunteers we studied the effect of a single subcutaneous dose of rG-CSF (300  $\mu$ g) on the expression and function of neutrophil Fc $\gamma$ -receptors (Fc $\gamma$ R). We observed that the neutrophils newly formed in response to rG-CSF, were Fc $\gamma$ RI (CD64) positive and were able to perform antibody-dependent cellular cytotoxicity. Fc $\gamma$ RII (CD32) expression was not changed significantly. Expression of the phospho-inositol (PI) linked Fc $\gamma$ RIII (CD16) was slightly increased immediately after injection and was found to be strongly decreased on the newly formed population. PI-linked CD14 and leukocyte alkaline phosphatase showed an increased expression on these cells. We found that the initially upregulated expression of Fc $\gamma$ RIII resulted from rG-CSF induced neutrophil degranulation. In conclusion, rG-CSF administration induces the formation of phenotypically and functionally altered neutrophils.