

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster  
– Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. W. Sibrowski –

Erythrozytenlysen in der Durchflusszytometrie erzeugen hochgradige Verluste  
von Leukozyten und hämatopoetischen Progenitorzellen bei der  
Qualitätssicherung von Stammzelltransplantaten

INAUGURAL- DISSERTATION

zur  
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Constanze Beller  
aus Münster

2004

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Heribert Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. W. Sibrowski
2. Berichterstatter: Univ.- Prof. Dr. W. Göhde

Tag der mündlichen Prüfung: 21.Juni 2004

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

– Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. W. Sibrowski –

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. W. Sibrowski

Coreferent: Univ.-Prof. Dr. W. Göhde

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juni 2004

### **Zusammenfassung**

#### Erythrozytenlysen in der Durchflusszytometrie erzeugen hochgradige Verluste von Leukozyten und hämatopoetischen Progenitorzellen bei der Qualitätssicherung von Stammzelltransplantaten

Constanze Beller

Bei Stammzelltransplantationen ist die exakte Quantifizierung von hämatopoetischen Stammzellen im Transplantat für den Patienten lebenswichtig. Dabei ist CD34 das entscheidende Oberflächenantigen für die durchflusszytometrische Bestimmung von Progenitorzellen. Frühere Studien haben die Präparation und dabei besonders die Erythrozytenlyse als wichtigen Einflussfaktor auf die durchflusszytometrische CD34<sup>+</sup>-Messung nachgewiesen. Eine Bestimmung der absoluten Zellverluste war mit bisherigen Methoden nicht möglich.

An 25 Blutprodukten (10 EDTA-Vollblutproben [VB], 10 Leukaphereseprodukte [LP] und 5 CD34-positivselektionierten Produkten [CD34/P]) wurden mit einem volumengesteuerten Durchflusszytometer die Einflüsse von 4 verschiedenen Erythrozytenlyseverfahren auf die Anzahl gemessener CD34<sup>+</sup> und CD45<sup>+</sup> Zellen untersucht. Als Referenz für die Zahl an CD34<sup>+</sup> Zellen diente die Zwei-Plattform (2PF) Messung nach dem deutschen Konsensusprotokoll. Bei dieser Methode ergibt sich die Absolutzahl CD34<sup>+</sup> Zellen erst durch den Bezug auf die absolute Leukozytenzahl, die an einem Hämatologiezählgerät getrennt gemessen wird. Das volumengesteuerte DFZ kann ohne Einbeziehung anderer Geräte Zellzahlen absolut bestimmen (Ein-Plattform-Methode, 1PF). Die volumengesteuerte Einheit wurde durch eine Leukozytenzählung mittels Kernfärbung und immunologischer Bestimmung gegenüber dem Referenzwert des Hämatologiezählgerätes geprüft.

Beide verwendeten Durchflusszytometer lieferten für die untersuchten Blutprodukte in der 2PF-Messung im direkten Vergleich gleiche Resultate ( $r$  [VB] = 0,997,  $r$  [LP] = 0,998,  $r$  [CD34/P] = 0,999). In der volumetrischen Zählung der immunmarkierten und lysierten Proben wurden signifikante Verluste ( $p \leq 0,01$ ) der CD34<sup>+</sup>-Zellen (VB 34-45%; LP 45-47%) und CD45<sup>+</sup> Zellen (VB 28-39%; LP 33-36%) im Vergleich mit der Referenzmethode gezeigt. Auch bei den aufgereinigten Stammzelltransplantaten (Reinheit 99,7%) betragen diese Verluste je nach Lyse 45-47%. Der Anteil von CD34<sup>+</sup> -Zellen an den Leukozyten blieb dabei relativ stabil (Abnahmen 3-12% [VB]), so dass sich in der 2PF-Messung nur diskrete Unterschiede zeigten. Die Kernfärbung am volumengesteuerten DFZ lieferte für die Kernfärbung von Leukozyten aus unlysierten Proben die nach der Referenzmethode (Hämatologiezählgerät) zu erwartenden Ergebnisse ( $r=0,998$ ) und verifizierte somit das volumetrische System. Mittels Kernfärbung, die nach Lyse und Immunmarkierung durchgeführt wurde, war kein signifikanter Unterschied zu den unlysierten Proben zu ermitteln.

Erythrozytenlysen bewirken einen großen Verlust von CD34<sup>+</sup> und CD45<sup>+</sup> Zellen. Da in den Kernfärbungen die Zellkerne noch nachweisbar bleiben, führt offensichtlich eine Membrandestruktion zu erniedrigten Werten in der immunologischen Messung. Erst durch die volumetrische Zytometrie wird das Ausmaß der Leukozytenverluste nach Erythrozytenlysen deutlich.

## INHALTSVERZEICHNIS

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung und Hintergrund</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1      | Die Stammzelltransplantation   | 1         |
| 1.1.1    | Patienten und Spender  | 2         |
| 1.1.2    | Stammzellapherese  | 3         |
| 1.2      | Die Rolle der CD34-Bestimmung bei<br>Stammzelltransplantationen              | 4         |
| 1.3      | Die Durchflusszytometrie   | 5         |
| 1.3.1    | Zellzahlbestimmung immunmarkierter Zellen                                    | 5         |
| 1.3.2    | Vollblutpräparation und Erythrozytenlyse                                     | 6         |
| 1.3.3    | Sicheres Definieren von Auswertefenstern (Gating)                            | 6         |
| 1.3.4    | Statistische Grenzen   | 7         |
| 1.3.5    | Leukozytenquantifizierung  | 7         |
| 1.4      | Mögliche Einflussfaktoren auf die durchflusszytometrische<br>CD34-Bestimmung | 8         |
| 1.4.1    | Fluoreszenzmarker  | 8         |
| 1.4.2    | Präparation von Zellen   | 8         |
| 1.4.3    | Bedeutung der Probenauswertung   | 10        |
| 1.5      | Alternative Oberflächenantigene früher hämatopoetischer<br>Progenitoren      | 11        |
| <b>2</b> | <b>Fragestellung</b>   | <b>13</b> |
| <b>3</b> | <b>Material und Methoden</b>   | <b>14</b> |
| 3.1      | Materialien  | 14        |
| 3.2      | Methoden   | 17        |
| 3.2.1    | Prinzip der Durchflusszytometrie   | 17        |
| 3.2.2    | Fluoreszenzmarkierung von Oberflächenantigenen                               | 18        |
| 3.2.3    | Zwei-Plattform-Methode (2PF)   | 20        |
| 3.2.4    | Ein-Plattform-Methode (1PF)  | 20        |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 3.2.5     | Versuchsablauf  | 21        |
| 3.2.6     | Präparation   | 23        |
| 3.2.7     | Auswertung und statistische Methoden  | 26        |
| 3.2.8     | Ein- und Ausschlusskriterien  | 27        |
| <b>4</b>  | <b>Ergebnisse</b>   | <b>28</b> |
| 4.1       | Präparationsbedingte Unterschiede   | 28        |
| 4.2       | Vergleich zweier Leukozytenzählmethoden                                       | 30        |
| 4.3       | Vergleich der Zwei-Plattform Messungen des S-DFZ und des V-DFZ                | 33        |
| 4.4       | Vergleich von Erythrozytenlyseverfahren am V-DFZ                              | 37        |
| 4.4.1     | Leukozytenzahlen in Vollblutproben  | 37        |
| 4.4.2     | Leukozytenzahlen in Aphereseprodukten   | 39        |
| 4.4.3     | CD34 <sup>+</sup> Progenitorzellen in Vollblutproben                          | 40        |
| 4.4.4     | CD34 <sup>+</sup> Progenitorzellen in Leukaphereseprodukten                   | 42        |
| 4.4.5     | Zellzahlen in CD34-aufgereinigten Proben                                      | 43        |
| 4.4.6     | Lyseeinflüsse auf den relativen Anteil der CD34 <sup>+</sup> Zellen           | 44        |
| 4.5       | Kernfärbung nach den Erythrozytenlysen  | 44        |
| 4.6       | Vergleich der Lyseverluste bei CD34 <sup>+</sup> und CD45 <sup>+</sup> Zellen | 46        |
| <b>5</b>  | <b>Diskussion</b>   | <b>48</b> |
| <b>6</b>  | <b>Abkürzungsverzeichnis</b>  | <b>58</b> |
| <b>7</b>  | <b>Abbildungsverzeichnis</b>  | <b>60</b> |
| <b>8</b>  | <b>Tabellenverzeichnis</b>  | <b>61</b> |
| <b>9</b>  | <b>Literaturverzeichnis</b>   | <b>62</b> |
| <b>10</b> | <b>Danksagung</b>   | <b>75</b> |

## 1 Einleitung und Hintergrund

### 1.1 Die Stammzelltransplantation

Die periphere Blutstammzelltransplantation (PBSCT) hat in den letzten Jahren immer größere Verbreitung gefunden und ersetzt zunehmend die invasivere Knochenmarkstransplantation.<sup>1 2</sup>

Der klassische Anwendungsbereich ist dabei die Therapie vielfältigster onkologischer und hämatologischer Krankheitsbilder.<sup>3 4 5 6</sup>

Die Stammzelltransplantation bietet für viele Patienten die einzige Heilungschance. Durch Hochdosis-Chemo-/ Radiotherapien bei onkologischen Erkrankungen soll eine radikalere Bekämpfung der neoplastischen Zellen erreicht werden als mit konventionellen Therapieschemata. Die Knochenmarkstoxizität ist dabei neben der Beeinträchtigung anderer Organfunktionen – wie des Magen-Darm-Traktes – der dosislimitierende Faktor.<sup>7</sup> Eine Dosisescalation des Chemotherapieregimes ist aber möglich, weil die Knochenmarkfunktion durch das Transplantat wieder übernommen wird.

Das Prinzip besteht darin, dem Patienten, der durch diese Hochdosis-Chemotherapie in Knochenmarksdepression (Aplasie) versetzt wurde, hämatopoetische Stammzellen zu transplantieren. Dieses Verfahren erlaubt eine Repopulation und eine dauerhafte Regeneration aller Zweige des blutbildenden Systems aus den Vorläuferzellen.<sup>8 9</sup>

Vorteil der PBSCT ist, dass sich der Patient aus der Aplasie nach einer Stammzelltransplantation mit peripherem Blut schneller erholt als nach einer Knochenmarkstransplantation.<sup>10</sup>

Für eine erfolgreiche Transplantation ist es entscheidend, die Anzahl der Stammzellen eines Transplantates zuverlässig zu charakterisieren, um ein sicheres Anwachsen der Zellen im Körper und damit das Überleben des Patienten gewährleisten zu können. Als wichtigster und anerkannter Marker für die Bestimmung von Progenitorzellen im Transplantat hat sich das Oberflächenantigen CD34 durchgesetzt.<sup>11</sup>

Inwieweit sich für Stammzelltransplantationen neue Therapiefelder erschließen, so z.B. bei degenerativen Erkrankungen in Kardiologie und Neurologie, bleibt abzuwarten.<sup>12 13</sup> Die korrekte Quantifizierung von Stammzellen ist jedoch auch für künftige Anwendungen entscheidend.

### 1.1.1 Patienten und Spender

Für die allogene Spende wird ein kompatibler Verwandten- oder Fremdspender benötigt. Zunächst wird dabei in der Familie nach Verwandten gesucht, die ein identisches HLA-Muster (engl. human leucocyte antigene) auf den Leukozyten tragen. Bei der PBSCT muss wie bei der Knochenmarktransplantation die weitgehende Identität von Spender- und Empfängermerkmalen gegeben sein, um eine Unverträglichkeitsreaktion in Form der Graft-versus-Host-Reaktion (GvH-Reaktion) zu vermeiden.<sup>14 15 16</sup>

Alternativ gibt es die Möglichkeit der autologen Stammzelltransplantation, bei der dem Empfänger nach der Hochdosis-Chemotherapie das vorher aus seinem Blut gewonnene und dann kryokonservierte Transplantat zurückgegeben wird. Dabei kann keine GvH-Reaktion auftreten; eine Tumorzellfreiheit im Transplantat kann jedoch nicht immer garantiert werden.<sup>15</sup>

Im Nabelschnurblut kommen undifferenzierte Progenitoren vor; sowohl die autologe als auch die allogene Cord-blood-Transplantation gewinnen zunehmend an Bedeutung. Wegen des geringen Transplantatvolumens und der folglich relativ niedrigen Stammzellzahl im Transplantat bleibt die cord blood-Transplantation zunächst jedoch überwiegend pädiatrischen Patienten vorbehalten.<sup>17</sup>

Für die Stammzellsammlung mittels Stammzellapherese werden Stammzellen, die hauptsächlich im Knochenmark vorliegen, durch Chemotherapie und/ oder Wachstumsfaktoren in den peripheren Blutpool mobilisiert.

Daher steigen die Stammzellzahlen als Reaktion auf eine Chemotherapie und durch die Anwendung des Wachstumsfaktors G-CSF an.<sup>18</sup>



Allogene Spender werden nur durch G-CSF mobilisiert, während bei Patienten mit autologer Transplantation Chemotherapeutika in Kombination mit G-CSF-Gabe angewendet werden.<sup>19 20</sup>

Um den richtigen Zeitpunkt für die Stammzellapherese bestimmen zu können, wird das Blut der mobilisierten Stammzellspender täglich auf den Gehalt an CD34<sup>+</sup> Zellen untersucht. Dieser als Monitoring bezeichnete Prozess erfolgt über ein immunologisches Testverfahren (Durchflusszytometrie). Der Zeitpunkt für die Apherese ist optimal, wenn möglichst viele CD34<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut zirkulieren. In der Regel sollten über 1000 Leukozyten/ $\mu$ l und über 10 CD34<sup>+</sup> Zellen/ $\mu$ l im Blut vorliegen.<sup>21 22 23</sup>

Praktisch wird so vorgegangen, dass beim chemotherapierten Patienten ein CD34<sup>+</sup>-Zellgehalt von 10/ $\mu$ l Vollblut abgewartet wird. Beim G-CSF mobilisierten Spender wird die Apherese i.d.R. am fünften oder sechsten Tag nach der Zytokingabe durchgeführt.<sup>22 24</sup>

### 1.1.2 Stammzellapherese

Unter Leukapherese versteht man eine Leukozytenaufreinigung aus peripherem Venenblut. Der Patient wird dabei an einen Zellseparator angeschlossen, der das Blutvolumen mehrfach kontinuierlich prozessiert und so ein Konzentrat mononukleärer Zellen gewinnt, das auch die Fraktion von Stammzellen umfasst.<sup>24</sup>

Die Ausbeute an Stammzellen ist abhängig vom prozessiertem Blutvolumen.<sup>25</sup> Es können dann Aufarbeitungsschritte folgen, die entweder die Stammzellen aufreinigen (Positivselektion) oder Tumorzellen bekannter Oberflächenantigenität entfernen (Negativselektion). Dieses Aufreinigungsverfahren kann auch zur Entfernung von Spender-T-Lymphozyten dienen, die bei allogenen Transplantationen die Effektorzellen der Graft-versus-Host-disease sind. Diese Zellen sind als wesentlicher Träger der zellulären Immunabwehr aber auch für die Immunreaktionen gegen Tumorzellen

bedeutsam, so dass eine Depletion dieser Lymphozyten im Transplantat auch die körpereigene Reaktion gegen die maligne Erkrankung behindern kann.<sup>26</sup>

Für all diese Verfahren ist jedoch die korrekte Quantifizierung der CD34<sup>+</sup> Zellen essentiell.

## 1.2 Die Rolle der CD34-Bestimmung bei Stammzelltransplantationen

Der Transplantationserfolg ist entscheidend abhängig von der genauen Kenntnis der Zahl CD34<sup>+</sup> Zellen im Transplantat.<sup>27</sup> Das etablierte Verfahren ist die Durchflusszytometrie. Klonogenitätsassays stellen ein Verfahren dar, welches zu Beginn der durchflusszytometrischen Stammzellzählung als Vergleichsmethode galt. Dabei werden die sich in vitro ausbildenden Granulozyten-/ Monozyten-Zellkolonien (engl: GM-Colony Forming Units/ GM-CFUs) gezählt. Dieser Test gibt auch wichtige Auskunft über das hämatopoetische Potential des Transplantates, in vivo anzuwachsen.<sup>28</sup> Aufgrund der hohen Korrelation der CFU-GM mit der CD34-Zellzahl im Transplantat, gilt die Zahl CD34<sup>+</sup> Zellen als ein guter Marker für die Transplantatqualität.<sup>29</sup>

Die Population der CD34-exprimierenden Zellen enthält unterschiedlich differenzierte hämatopoetische Stammzellen, aus denen sich alle Zellen des Blutbildes differenzieren können. Zudem besitzt sie das Potenzial, sich selbst zu erneuern. Diese Zellen sind also in der Lage, nach der Transplantation dauerhaft das hämatopoetische System der Patienten wiederaufzubauen.<sup>30</sup> Ihre Absolutzahl gilt als etablierter Marker für die Quantifizierung von Stammzelltransplantaten.<sup>22</sup>

Ein entscheidender Vorteil der Durchflusszytometrie ist, dass die Ergebnisse der Messungen am selben Tag verfügbar sind, während die Qualitätskontrolle mittels Klonogenitätsassay ein Anwachsen der Zellen über in der Regel vierzehn Tage erfordert. Darüber hinaus zeigen Klonogenitätsassays als Zellkulturversuche eine erheblich höhere Variabilität (Unpräzision). Um eine erfolgreiche Transplantation zu gewährleisten, muss die genaue Zahl an CD34<sup>+</sup>

Zellen pro Volumeneinheit bestimmt und auf das Körpergewicht des Patienten bezogen werden.<sup>31</sup>

Für eine autologe Transplantation wird dabei gemäß der deutschen Richtlinien als Mindestmenge eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> Zellen pro kg und für die allogene Transplantation zumindest  $4 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> Zellen pro kg Körpergewicht des Empfängers angestrebt.<sup>23 24</sup>

Diese Menge kann bei autologen und allogenen Transplantaten meist über eine entsprechende Apherasetechnik und Aufbereitung der Zellen problemlos gewonnen werden. Bei Nabelschnurtransplantaten taucht dagegen häufig das Problem auf, dass das relativ geringe Transplantatvolumen zu wenig CD34<sup>+</sup> Zellen enthält.

### 1.3 Die Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Bestimmung immunmarkierter Zellen gehört zu den Basistechniken der Immunologie. Seit Ende der sechziger Jahre wurden die Vorläufer der heutigen Durchflusszytometer konstruiert, die wegen ihrer breiten Anwendbarkeit rasch in die Labore Einzug hielten. Erstmals konnten so große Zellzahlen innerhalb kürzester Zeit analysiert werden.<sup>32</sup>

Dabei sind die Anwendungsbereiche der Durchflusszytometrie sehr vielfältig. Für die Medizin ist u.a. die Klassifikation und Quantifizierung bestimmter Zellgruppen über die immunologische Charakterisierung oder über ihren DNA/RNA-Gehalt besonders in der Onkologie, Hämatologie und Transfusionsmedizin bedeutsam.

#### 1.3.1 Zellzahlbestimmung immunmarkierter Zellen

Die Absolutzahl CD34<sup>+</sup> immunmarkierter Zellen kann über verschiedene durchflusszytometrische Verfahren bestimmt werden. Neben der Zwei-Plattform (2PF) Technik, bei der der absolute Leukozytenwert an einem Hämatologie-Zählgerät ermittelt wird und die Fraktion an CD34<sup>+</sup> Zellen am

Durchflusszytometer bestimmt wird, gibt es die Möglichkeit, mittels Ein-Plattform (1PF) Technik über synthetische Mikrokügelchen (beads), deren Zahl pro Volumeneinheit bekannt ist und die vom Zytometer parallel registriert werden, relevante immunmarkierte Zellen zu quantifizieren.

Andere Methoden haben sich für die Progenitorzellquantifizierung weniger durchgesetzt, z.B. die Mikrovolumen-Fluometrie, bei der in einem Kapillarvolumen die immunmarkierten Zellen abgetastet werden.<sup>33</sup> Eine weitere Methode, die sich nicht gegen den durchflusszytometrischen Qualitätsstandard durchsetzen konnte, ist die Impedanzbestimmung von hämatopoetischen Progenitor-Zellen (HPC-Zellen) mit modifizierten Hämatologiezählgeräten.<sup>34</sup>

### 1.3.2 Vollblutpräparation und Erythrozytenlyse

Sowohl bei der 1PF- als auch bei der 2PF-Messung müssen die Proben zunächst präpariert werden (Prä-Analytik). Die Erythrozytenlyse ist für die immunzytometrische Messung ein wichtiger Schritt, weil die fluoreszenzoptische Erfassung im Durchflusszytometer von einer Überzahl an Erythrozyten gestört wird.

### 1.3.3 Sicheres Definieren von Auswertefenstern (Gating)

Um Fehler in der dot-plot Auswertung so gering wie möglich zu halten und um die Auswertungsstrategie zu standardisieren, wurden in den letzten Jahren zahlreiche Protokolle entwickelt. Eines der ersten Protokolle dieser Art war das Milan-Protokoll. Das Protokoll beinhaltet eine CD34-Fluoreszenzfärbung, eine Erythrozytenlyse mit Waschsritten und eine recht einfache Gating-Strategie. Das Cluster der CD34<sup>+</sup> Zellen und die Leukozyten werden eingegrenzt und die Absolutzahl der CD34<sup>+</sup> Zellen im Sinne einer 2PF-Auswertung ermittelt.<sup>35 36</sup>

Auf diesem Verfahren baut das Mulhouse-Protokoll auf, bei dem eine Zweitfärbung mit CD45 als Panleukozytenmarker und eine Isotypkontrolle durchgeführt werden.<sup>37</sup> Das ISHAGE-Protokoll erhöhte die Sicherheit der

CD34-Bestimmung durch Auswertung mit mehrmaligem Backgating basierend auf einer CD34- und CD45-Markierung der Zellen.<sup>38</sup> Das ISHAGE-Protokoll und das Konsensus-Protokoll der DGTI und DGHO sind insgesamt vergleichbar.<sup>24</sup>

#### 1.3.4 Statistische Grenzen

Für die Bestimmung von Leukozyten-Subpopulationen gilt prinzipiell dasselbe wie für die Analyse niedriger Leukozytenzahlen. Niedrige Zellkonzentrationen machen die Untersuchung größerer Volumina nötig, um geringe Variationskoeffizienten zu erhalten.<sup>39 40</sup> Bei der nicht-volumetrischen Durchflusszytometrie werden diese Bedingungen erfüllt, indem zu messende Mindestzellzahlen vorgegeben werden.<sup>24</sup> Bei der volumetrischen Durchflusszytometrie erreicht man durch ein hohes Probenvolumen, dass statistisch ausreichend Zellen untersucht werden.

#### 1.3.5 Leukozytenquantifizierung

Standardverfahren zur Leukozytenbestimmung sind heute Hämatologiezählgeräte, bei denen die Zellzahl über das Impedanzprinzip und eine weitere Leukozytendifferenzierung mittels einer Streulichtbestimmung ermittelt werden. Zur Leukozytenbestimmung wird auch dort eine Erythrozytenlyse verwandt.<sup>41</sup>

Eine weitere durchflusszytometrische Methode der Leukozytenzählung basiert auf dem Prinzip einer Kernzählung. Diese Methode liefert mit den Hämatologiezählgeräten vergleichbare Werte, kann jedoch auch niedrigere Leukozytenzahlen zuverlässig bestimmen.<sup>42</sup>

## 1.4 Mögliche Einflussfaktoren auf die durchflusszytometrische CD34-Bestimmung

### 1.4.1 Fluoreszenzmarker

Die korrekte Quantifizierung von Progenitorzellen unterliegt verschiedenen Einflussgrößen, so ist die Wahl des optimalen Fluoreszenzmarkers und die Art der Präparation genauso entscheidend wie die Auswertestrategie. Die Kopplung an den Fluoreszenzfarbstoff PE verspricht – auch bei niedriger Antigenexpression – durch eine geringe Autofluoreszenz ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis im Vergleich zum Farbstoff FITC, eine gute Signalqualität und wird deshalb für die CD34-Bestimmungen empfohlen.<sup>22</sup>

Der Einfluss verschiedener CD34-Isotypen auf die durchflusszytometrische Messung ist nicht wesentlich.<sup>43</sup>

### 1.4.2 Präparation von Zellen

Der Verlust von Zellen durch Präparationseinflüsse ist mittels durchflusszytometrischer Technik und gleichzeitiger Immunmarkierung bisher nicht untersucht. Der Verlust von Leukozytenpopulationen konnte an konventionellen Durchflusszytometern bisher nur relativ bestimmt werden, weil diese signalgesteuert arbeiten. Das bedeutet, dass die Zellsignale unabhängig vom analysierten Volumen registriert werden.

Dabei fiel zunächst auf, dass sich unter verschiedenen Lysen die relativen Anteile und die Lage der Leukozytenpopulationen sowohl in den Streulichteigenschaften als auch in den Fluoreszenzdarstellungen signifikant veränderten.<sup>44</sup> So wurden die Unterschiede der verschiedenen Präparationen durch selektiven Verlust einiger Leukozytenuntergruppen, wie z.B. der CD34<sup>+</sup> Zellen, diskutiert.

Der Einfluss verschiedener Erythrozytenlyseverfahren auf die CD34<sup>+</sup>-Bestimmung in Nabelschnurblut konnte 1998 von Cassens et al. gezeigt

werden.<sup>45</sup> In einigen Proben waren je nach Lyseprotokoll Unterschiede der CD34<sup>+</sup>-Zellzahlen bis zu 100% nachweisbar.

Ammoniumchlorid-Lysen stehen in Verdacht, Apoptose und Nekrose von Leukozyten zu induzieren, insbesondere wenn die empfohlene Einwirkzeit überschritten wird.<sup>46 47</sup>

Die Einflüsse eines Fixativ-Zusatzes auf Fluoreszenzsignale, Zellgröße und Probenstabilität sind ebenfalls nur für die relativen Anteile von CD34 und anderen Antigenen beschrieben.<sup>48 49</sup> Fixanzhaltige Erythrozytenlysen bewirken eine bessere Diskriminierung der Leukozytenpopulationen, zeigen aber tendenziell niedrigere CD34<sup>+</sup>-Werte als die fixanzfreie Ammoniumchlorid-Lysen. Auch sind besonders bei fixanzhaltigen Erythrozytenlysen Zellverluste nach Zentrifugation und Resuspendierung beschrieben.<sup>25 48 50</sup>

Waschschritte sind für volumetrische Untersuchungen obsolet, weil danach der Bezug zwischen Zellzahl und ursprünglichem Volumen weitestgehend verloren geht.

Durch Erythroblasten (engl: nucleated red blood cells= NRBC), die in Nabelschnurblutproben oder selten bei akuten oder chronischen Erkrankungen mit einem Anteil von 1 - 110 NRBC/ 100 Leukozyten auftreten können, kann der Lyseprozess gestört werden.<sup>49</sup> Auch könnten diese Zellen wegen ihrer ähnlichen Morphologie (kernhaltig) im Hämatologiezählgerät als Leukozytensignal verarbeitet werden und so die Leukozyten- und Stammzellzählung verfälschen.

Besonders bei 1PF-Messungen spielen sorgfältiges Pipettieren – insbesondere des Ausgangsvolumens und der bead-Suspension – und eine korrekte Handhabung der Proben, z.B. beim Vortexen, eine große Rolle, weil vom Ausgangsvolumen für die durchflusszytometrischen Messungen direkt auf die Zellzahl/ Volumeneinheit geschlossen wird.<sup>51 52</sup> Weitere Unterschiede bei der Messung gleicher Proben mit verschiedenen durchflusszytometrischen Techniken können in der Gerätekonstruktion, der Signalübertragung und in Softwareverarbeitung begründet sein.

### 1.4.3 Bedeutung der Probenauswertung

Verschiedene Auswerter können beträchtliche Unterschiede in der Bestimmung der CD34<sup>+</sup>-Zellzahlen hervorrufen. Trotz standardisierter Auswertungsstrategien lassen sich die fluoreszenzmarkierten Populationen nur mehr oder weniger gut eingrenzen. Dies gilt insbesondere, wenn der Anteil der CD34 exprimierenden Population gering ist. Multi-Center-Studien und Ringversuche sind wichtig, um die CD34-Zellzahlen der Laboratorien untereinander vergleichen zu können. Standardisierte Protokolle tragen wesentlich zur Angleichung der Resultate verschiedener Laboratorien bei.<sup>53 54 55 56 57</sup> Das ISHAGE-Protokoll wird dabei als die verlässlichste Auswertungsmethode der 2PF-Verfahren beschrieben.<sup>58</sup> Die 1PF-Methode mit Verwendung von Mikropartikeln – „beads“ – wird vielfach wegen der geringeren Intra- und Interlabor-Unterschiede als neuer Standard angeraten<sup>53 57 59 60</sup> oder zumindest als der 2PF-Methode gleichwertig angesehen.<sup>61 62 63</sup>

Allerdings ist die 2PF-Methode – u.a. wegen der Unabhängigkeit von kostspieligen Mikropartikeln – die bevorzugte Methode und wird auch in den aktuellen Veröffentlichungen deutscher Fachgesellschaften (DGTI und DGHO) empfohlen.<sup>24</sup> Alle diese Techniken können sich von dem Problem einer mangelhaften Kalibrierung nicht freimachen, denn die Referenzwerte werden ebenfalls mit Geräten bestimmt, die auf gleichen Prinzipien basieren und damit nicht zur Kontrolle von in der Methodik begründeten Fehlern beitragen können. Zum objektiven Vergleich werden die Geräte in Ringversuchen abgeglichen.

Die korrekte Präparation und Probenauswertung spielen also bei der CD34-Quantifizierung eine herausragende Rolle, weil nicht zuletzt von der exakten Bestimmung des CD34-Wertes der Transplantationserfolg abhängt. Die durchflusszytometrischen Methoden büßen gerade im Bereich niedriger CD34-Zellkonzentrationen (<20 CD34<sup>+</sup>/µl) an Zuverlässigkeit ein.<sup>39</sup>

Der Konsensus für die Entscheidung zu einer Stammzellapherese liegt aber gerade in diesem kritischen Bereich, so dass auch geringe Abweichungen der bestimmten CD34<sup>+</sup>-Zahlen große Relevanz für den Patienten haben.



## 1.5 Alternative Oberflächenantigene früher hämatopoetischer Progenitoren

Eine verlässliche durchflusszytometrische Quantifizierung ist auch für andere Oberflächenantigene von hämatopoetischen Progenitoren essentiell. Um Zellen als besonders früh in der hämatopoetischen Reihe einzuordnen, sind auch andere Co-Expressionsmarker z.B. CD38-, CD90-, HLA-DR- und CD133 geeignet.<sup>64</sup> CD133-positive Progenitorzellen stellen eine Zellfraktion dar, die der Stammzelle nahe steht; auch sie hat endotheliales Potential und entwickelt alle hämatopoetische Linien.<sup>65 66</sup> Die früheste humane hämatopoetische Stammzelle wird am ehesten als KDR (VEGFR-2, vascular endothelial growth factor Receptor-2) exprimierend und damit den endothelialen Zellen nahestehend eingegrenzt.<sup>67 68</sup> Der Anteil dieser Zellen an den aufgereinigten CD34-Zellen aus peripherem mobilisierten Blut beträgt nur zwischen 0,1-0,5%<sup>67 69 70</sup>

Mit der Zeit stellte sich heraus, dass nicht nur die CD34<sup>+</sup> Leukozytenfraktion Stammzellen enthält, sondern auch CD34-negative Leukozyten Stammzellverhalten zeigen.<sup>71 72 73 74 75</sup>

Außerdem verhalten sich CD34-Progenitor-Subpopulationen hinsichtlich ihres Anwachsens unterschiedlich.<sup>76</sup>

Für die Transplantatqualität sind sowohl Zellen wichtig, die eine schnelle Regeneration aus der Aplasie ermöglichen, als auch Zellen, die langzeitige Erholung gewährleisten. Diese Funktionen werden von den Zellen verschiedener Entwicklungsstufen unterschiedlich gut erfüllt. Die Subpopulationen der CD34<sup>+</sup> HPC sind für die Routine-Quantifizierung schwer zugänglich, da ihre Absolutzahlen teils noch weit unter denen der CD34<sup>+</sup> Zellen liegen.<sup>70</sup> Deshalb ist die Bestimmung der Subklassen noch nicht Standard zur routinemäßigen Qualitätskontrolle von Stammzelltransplantaten, zumal die CD34<sup>+</sup>-Zellzahl zunächst ein guter Kompromiss auf dem Weg zur praktikablen Stammzellzählung zu sein scheint.

Ziel auf Dauer ist aber, auch die Subklassenanalyse zu standardisieren und in die Routine eingehen zu lassen.<sup>77</sup>

– Einleitung und Hintergrund –

Gerade bei der Quantifizierung von Subpopulationen der CD34<sup>+</sup> Zellen, die nur einen kleinen Teil der Leukozyten ausmachen, ist es wichtig, sensitive durchflusszytometrische Methoden zu entwickeln.

## 2 Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Stellenwert der volumetrischen Durchflusszytometrie (1PF-Technik) bei der Quantifizierung immunmarkierter CD34<sup>+</sup> hämatopoetischer Progenitorzellen im Vergleich zur etablierten Zwei-Plattform (2PF)-Methode untersucht werden.

Zu diesem Zweck wird die volumetrische Einheit zunächst auf ihre Richtigkeit geprüft, indem die durch Kernfärbung am volumetrischen Zytometer erhobene Leukozytenzahl mit der des Hämatologiezählgerätes verglichen wird.

Außerdem soll das volumetrische und signalgesteuerte Durchflusszytometer jeweils im Modus der 2PF-Messung verglichen werden. Dabei ist relevant, dass beide Zytometer nach gleicher Probenaufbereitung und standardisierter Auswertung gleiche CD34<sup>+</sup>-Prozentanteile an den CD45<sup>+</sup> Leukozyten ermitteln.

Schwerpunktmäßig soll durch die volumetrischen Messungen (1PF) im Vergleich mit der Referenzmethode (2PF) geklärt werden, inwieweit verschiedene Präparationen, insbesondere Erythrozytenlysen, durch morphologische Veränderung die Zählung von Leukozyten und hämatopoetischen Progenitorzellen absolut beeinflussen.

Mit der bisherigen durchflusszytometrischen Zählung sind derzeit nur relative Unterschiede zwischen unterschiedlichen Zellklassen erfassbar. Die volumetrische Einheit erlaubt demgegenüber, absolute Differenzen direkt zu messen.

Ziel der Untersuchungen ist es, Zuverlässigkeit, mögliche Einflussfaktoren, Praktikabilität und Qualität der einzelnen Methoden beurteilen. Für die optimale Stammzellzählung ist eine Methode höchster Genauigkeit und Richtigkeit wichtig, um dem Patienten den Therapieerfolg – eine möglichst schnelle Erholung aus der Aplasie und ein gutes Langzeitergebnis – zu sichern. Ferner ist eine möglichst schnelle und einfache Technik mit wenig Reagenzien aus ökonomischen Erwägungen wünschenswert.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

Folgende Proben wurden unter verschiedenen Präparationen auf die Leukozytenzahl und den CD34<sup>+</sup>-Gehalt untersucht:

- K-EDTA Vollblut (VB) von 10 Patienten
- Leukapherese Proben (LP) von 10 Patienten
- CD34 aufgereinigte Proben (CD34/P) von 5 Patienten

Es wurden daraus insgesamt 450 Messungen durchgeführt.

In Tabelle 1 ist das Patientenkollektiv unter Angabe der Geschlechtsverteilung, des Altersspektrums und der Diagnosen aufgeführt. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug  $36 \pm 22$  Jahre. Die Patienten wiesen verschiedene onkologische Diagnosen auf. Daneben wurden die Transplantate von zwei allogenen Spendern untersucht.

Alle Patienten wurden chemotherapeutisch, die allogenen Spender mit G-CSF vorbehandelt.

Die Proben wurden am selben Tag gewonnen, präpariert und gemessen, um zu gewährleisten, dass eine hohe Lebensfähigkeit der Zellen vorliegt.

Bei Routinetestungen hat sich dabei eine Lebensfähigkeit von in der Regel über 98% gezeigt.

| Probe | Patient        | Geschlecht | Alter | Diagnose             | Probenart |
|-------|----------------|------------|-------|----------------------|-----------|
| 1     | F. H.          | m          | 60    | Multiples Myelom     | VB        |
| 2     | G. D.          | m          | 41    | Non-Hodgkin-Lymphom  | VB        |
| 3     | H. B.          | w          | 62    | Multiples Myelom     | VB        |
| 4     | R. H.          | m          | 9     | Hepatoblastom        | VB        |
| 5     | F. W.          | m          | 46    | CLL                  | VB        |
| 6     | K. S.          | m          | 21    | ALL                  | VB        |
| 7     | B. M.          | w          | 66    | k. A.                | VB        |
| 8     | R. S.          | m          | 39    | Keimzell-Tumor       | VB        |
| 9     | R. W. 11.04.01 | m          | 9     | Ewing-Sarkom         | VB        |
| 10    | R. W. 12.04.01 | m          | 9     | Ewing-Sarkom         | VB        |
| 11    | F. W.          | m          | 46    | CLL                  | LP        |
| 12    | M. K.          | m          | 21    | allogener Spender    | LP        |
| 13    | R. W.          | m          | 64    | Multiples Myelom     | LP        |
| 14    | J. T.          | m          | 4     | Klarzellsarkom Niere | LP        |
| 15    | P. B.          | m          | 16    | allogener Spender    | LP        |
| 16    | E. W.          | w          | 44    | Non-Hodgkin-Lymphom  | LP        |
| 17    | K. P.          | m          | 48    | Seminom              | LP        |
| 18    | K. P.          | m          | 48    | Seminom              | LP        |
| 19    | W. K.          | m          | 59    | Non-Hodgkin-Lymphom  | LP        |
| 20    | C. W.          | m          | 31    | Keimzelltumor        | LP        |
| 21    | F. W.          | m          | 61    | CLL                  | CD34/P    |
| 22    | K. S.          | w          | 2     | Neuroblastom         | CD34/P    |
| 23    | V. B.          | w          | 4     | Neuroblastom         | CD34/P    |
| 24    | A. D.          | m          | 23    | Weichteiltumor       | CD34/P    |
| 25    | C. F.          | w          | 64    | Multiples Myelom     | CD34/P    |

Tabelle 1: Patientenkollektiv.

Die verwendeten Geräte sind im folgenden mit Angabe der später eingesetzten Abkürzungen aufgeführt:

- Zellzählgerät (HC): K-1000, Fa. SYSMEX, Kobe, Japan
- Signalgesteuertes Durchflusszytometer (S-DFZ): FACScan, Fa. Becton Dickinson, San Jose, USA mit CellQuest-Software und 488 nm Laser-Anregung
- Volumengesteuertes Durchflusszytometer (V-DFZ): Partec PAS mit 488 nm Argon-Laser, Quecksilberhochdrucklampe (Fa. Osram, München) und FloMax-Software; Fa. Partec GmbH, Münster
- Zentrifugen: Immucient II, Fa. Dade Diagnostika, Unterschleißheim und Labofuge GL, Fa. Heraeus Christ
- Pipetten-Sets, Fa. Eppendorf, Hamburg

Reagenzien für die Messungen am S-DFZ :

- PBS Dulbecco`s; Fa. Gibco BRL, Painsley, Scotland
- Calibrite Beads; Fa. Becton Dickinson, San Jose, USA
- FacsFlow; Fa. Becton Dickinson
- CD45-FITC Antikörper (Klon J33) Kat. Nr. 0647, Fa. Immunotech, Marseilles, Frankreich
- CD34-PE Antikörper (Klasse III Anti-HPCA-2, Klon 8G12 ) Kat. Nr. 345802, Fa. Becton Dickinson
- Mouse  $\gamma_1$  (IgG<sub>1</sub>)-PE ; Kat. Nr. 349043, Fa. Becton Dickinson
- Lyse-Reagenz Ortho-mune; Art. 960766, Fa. Ortho-Diagnostic-Systems GmbH, Neckargemünd

Verbrauchsmaterial (S-DFZ):

- Messröhrchen: Falcon 5ml 12x75mm polystyrene round bottom-tubes, Nr. 352052 Fa. BD Labware Franklin Lakes N.J. , USA

Reagenzien für die Messungen am V-DFZ:

- PBS (laboreigene Herstellung)
- CD45-FITC Antikörper (Klon J33) Kat. no 0647, Fa. Immunotech
- CD34-PE Antikörper (Klasse III Anti-HPCA-2, Klon 8G12) Kat. Nr. 345802  
Fa. Becton Dickinson
- Mouse  $\gamma_1$  (IgG<sub>1</sub>)-PE Kat. Nr. 349043, Fa. Becton Dickinson
- Kernfärbung: CyStain R, Fa. Partec

Erythrozyten-Lyseprotokolle:

1. Ortho-mune Lyse (OD-L); Art. 960766, Fa. Ortho-Diagnostic-Systems GmbH, Neckargemünd
2. Dako Uti-Lyse (DA-L), Fa. Dako, Carpinteria, USA
3. BD FACS Lysing Solution (BD-L) , Fa. Becton Dickinson
4. CyLyse (CY-L), Fa. Partec

Verbrauchsmaterial (V-DFZ):

- Messröhrchen: Fa. Sarstedt Nr./ Ref. 55.484 3,5ml 55x12mm

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrische Untersuchung müssen die Zellen in einer Suspension vorliegen. Getragen vom Hüllstrom werden die Zellen einzeln analysiert.

Das optische System eines Durchflusszytometers besteht aus einem Anregungsteil und einem Detektionsteil. Im Anregungsteil wird der Laserstrahl auf die Zellen im Messpunkt fokussiert. Im Detektionsteil werden die Signale nach Durchtritt verschiedener Filter und Blenden registriert. Eine Photodiode empfängt die Vorwärtsstreulichtsignale (Forward angle scatter = FSC),

Photomultiplier registrieren das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter = SSC) und die Fluoreszenzsignale.<sup>78</sup>

Nach der Signalbearbeitung werden die Daten digitalisiert und als Rohdaten gespeichert. Diese lassen sich dann ein- und zweidimensional auftragen, womit man die klassischen Diagramme erhält. Im FSC/SSC-Diagramm (Abb. 1) sind die Zellen nach ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) in dimensionslosen Kanälen aufgetragen.<sup>78</sup>

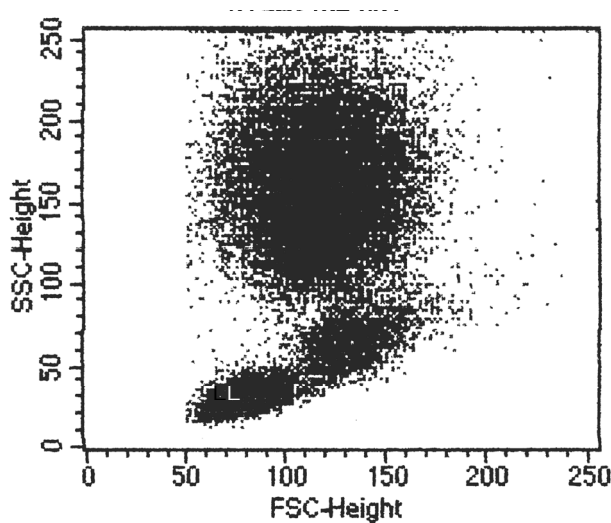


Abbildung 1: FSC/SSC-Diagramm einer Vollblutprobe.

G= granulozytäre Zellen, M= monozytäre Zellen, L= lymphozytäre Zellen.

### 3.2.2 Fluoreszenzmarkierung von Oberflächenantigenen

Oberflächenantigene wie CD-Antigene können mit Hilfe fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper markiert und im Durchflusszytometer gemessen werden. Dabei werden Zellen mit hohen Fluoreszenzsignalen in den jeweils höheren Kanälen registriert und im Diagramm aufgetragen (Abb.2)



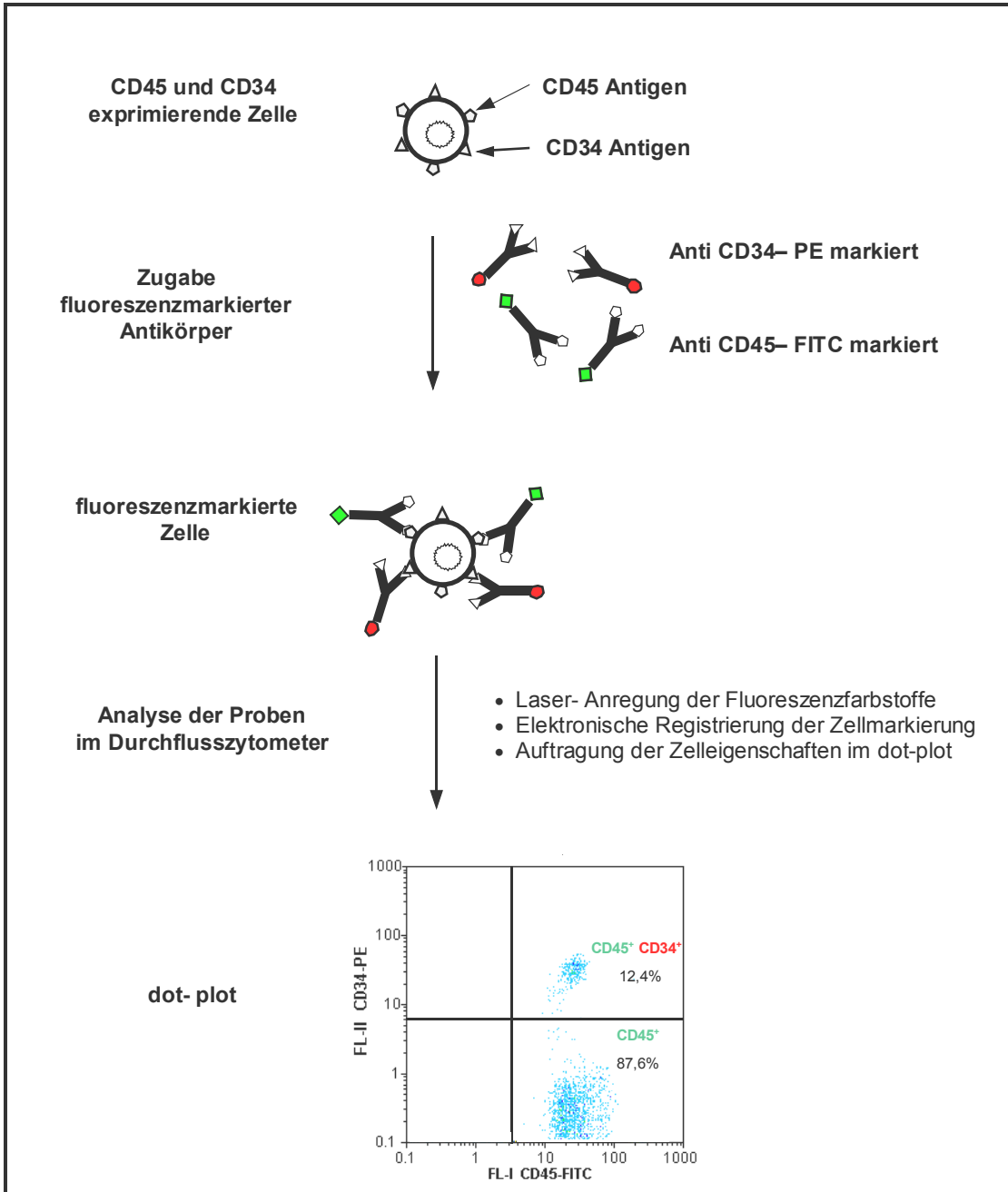


Abbildung 2: Schema Fluoreszenzmarkierung von Zellen und ihre Erfassung im Durchflusszytometer.

### 3.2.3 Zwei-Plattform-Methode (2PF)

Die 2PF-Methode beruht auf zwei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen, bei denen zunächst die absolute Leukozytenzahl in der Probe an einem Hämatologie-Zählgerät (HC) bestimmt wird. Leukozyten werden am HC nach dem Impedanzprinzip identifiziert und deren Zahl ermittelt. Die CD34<sup>+</sup> Zellen werden in einem zweiten Schritt am Durchflusszytometer relativ zu den CD45<sup>+</sup> Zellen (=Leukozyten) bestimmt. Eine Absolutzahl an CD34<sup>+</sup> Zellen ergibt sich erst durch den Bezug dieser beiden Zahlenwerte.

Da die Messung am signalgesteuerten DFZ nach dem 2PF-Prinzip abläuft, wurden wie im Konsensusprotokoll der DGTI vorgeschlagen, jeweils 50000 Ereignisse gezählt. Der Schwellenwert zum Ausblenden von Störsignalen durch Debris wurde auf Kanal 200 gesetzt und das Leukozytendiagramm in einem Vorlauf so eingestellt, dass Nebengeräusche unterhalb dieser Schwelle lagen. Als Auslöser (Trigger) für die Registrierung eines Partikels wurde das Vorwärtsstreulicht genutzt.

### 3.2.4 Ein-Plattform-Methode (1PF)

Im Vergleich zur 2PF-Methode wird die absolute Zellzahl mit der 1PF-Technik an nur einem Gerät bestimmt. Weit verbreitet ist die Verwendung von Mikropartikeln –„beads“– vorgegebener Konzentration, die einer bekannten Probenmenge zugesetzt werden. Durch Parallelzählung von bead- und Fluoreszenzsignalen wird ein Absolutergebnis in der Probe errechnet.

Eine andere Art der 1PF-Messung ist die volumengesteuerte Messung, bei der die Zellzahl in definierten Messvolumen bestimmt wird.

Beim volumetrischen DFZ (Abb. 3) pumpt ein elektronisch gesteuerter Kolben Luft in das abgedichtete Probenröhrchen. Der Druck transportiert die Flüssigkeit in Richtung der Küvette. Der Abriss des Flüssigkeitsmeniskus von der oberen Elektrode startet, von der unteren Elektrode beendet den Zählprozess. Nach

Herstellerangaben beträgt das gemessene Volumen 200µl mit einer Abweichung von ± 2%.

Gegenüber der S-DFZ Messung handelt es sich hierbei um eine volumetrische Quantifizierung, bei der standardmäßig die in 200µl der Präparation vorhandenen Partikel gezählt werden. Die Zahl der gezählten Partikel liegt somit für Vollblutproben und Leukapherisate in der Regel wesentlich über 50000 Ereignissen. Die Debrisschwelle wurde auf 50 eingestellt; als Triggerparameter war wie bei der S-DFZ Messung das Vorwärtsstreulicht eingestellt.

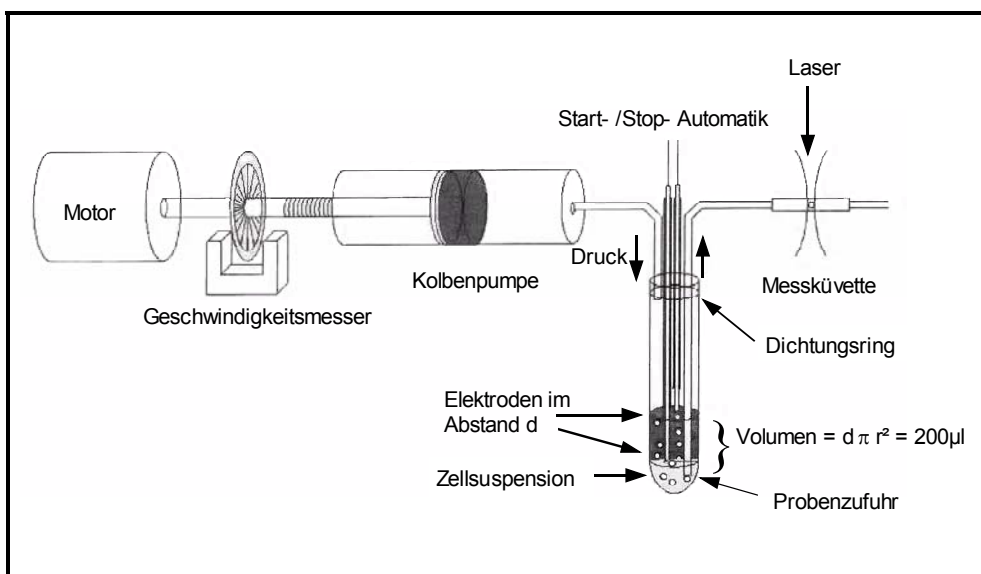


Abbildung 3: Prinzip des volumetrischen Durchflusszytometers (V-DFZ).

### 3.2.5 Versuchsablauf

Die Stammzellzählung wurde einerseits nach dem Konsensusprotokoll der DGTI<sup>24</sup> am signalgesteuerten Durchflusszytometer (S-DFZ) in Kombination mit dem Hämatologiezählgerät (2PF) mit lysierten und gewaschenen Proben (OD-LW) durchgeführt (Abb. 4). Diese Methode wird routinemäßig im Institut für Transfusionsmedizin der Universität Münster zur Bestimmung von CD34<sup>+</sup> Zellen in mobilisiertem peripheren Blut, Leukaphereseprodukten und CD34<sup>+</sup> selektionierten Produkten eingesetzt.

Andererseits wurden die unterschiedlich lysierten Proben am volumengesteuerten Durchflusszytometer (V-DFZ) sowohl im 2PF (OD-LW lysiert) als auch im 1PF Modus (OD-L, BD-L, DA-L, CY-L lysiert) gemessen (Institut für Strahlenbiologie, Universität Münster). Somit war ein direkter Vergleich zwischen der etablierten Technik und der Absolutzellzählung am V-DFZ möglich.

Außerdem wurden sowohl die nativen als auch die lysierten Proben kerngefärbt (KF).

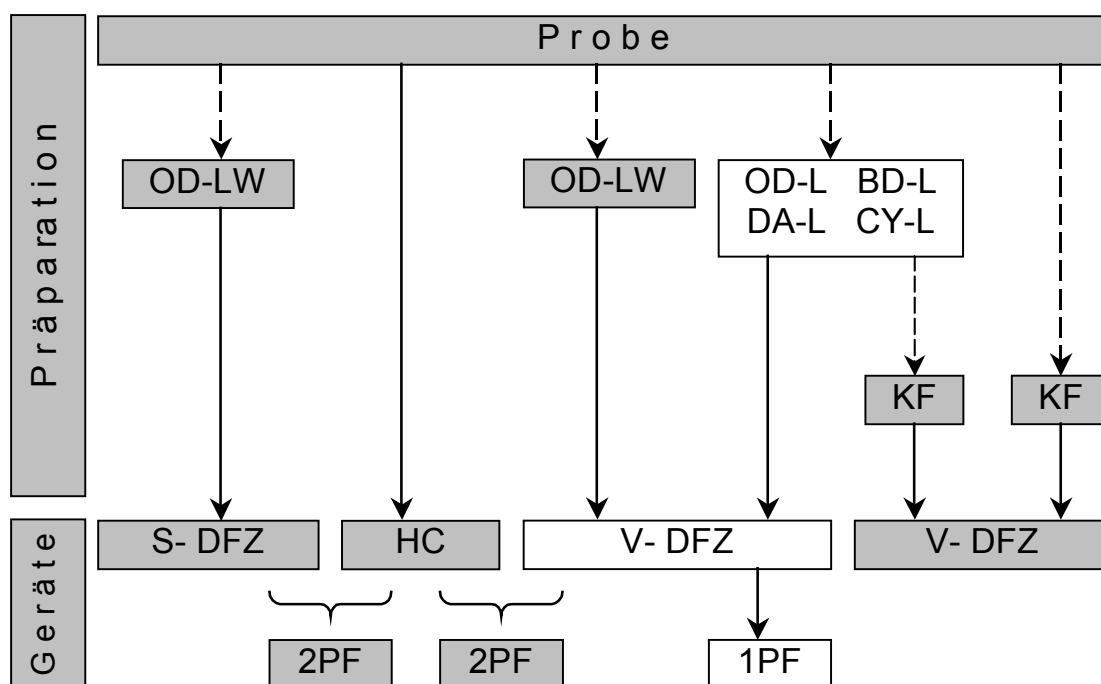


Abbildung 4: Versuchsablauf.

Je Probe wurden somit 18 Bestimmungen durchgeführt.

Der Unterschied zwischen den Arbeitsweisen und Auswertungen in den beiden Instituten sollte so gering wie möglich sein, um die Geräte direkt vergleichbar zu machen. Allerdings ergaben sich im Zusammenhang mit der Absolutzählung technikbedingte Unterschiede, insbesondere bei der Lysetechnik. Die einzelnen Lysen sollten bei den gleichen Proben auf Einflüsse auf die absoluten Leukozyten und Stammzellzahlen untersucht werden. Die Unterschiede in den

Ansätzen für die Geräte bedingten sich durch die verschiedenen Messmethoden. Um den rechnerischen Zusammenhang zwischen Mess- und Ausgangsvolumen zu erhalten, musste bei der volumetrischen Messung auf Waschschriffe verzichtet werden.

Das volumetrische Messprinzip erlaubte das Erfassen aller Ereignisse in einem definierten Volumen von standardmäßig 200µl Volumen. Dies entsprach je nach Präparation einem Nettovolumen zwischen 8,93µl und 19,23µl Originalprobe. Das Prinzip der 2PF-Messung wurde zum Zwecke des direkten Vergleichs mit beiden Durchflusszytometern durchgeführt. Darüber hinaus erfolgte am volumetrischen Gerät eine Leukozytenquantifizierung durch Kernfärbung, um zu untersuchen, ob es unterschiedliche Einflüsse der Erythrozytenlysen auf Zellkerne und -membranen geben könnte.

Verschiedene handelsübliche Erythrozytenlysen wurden entsprechend den Herstellerprotokollen eingesetzt und für alle Proben die CD45<sup>+</sup> Leukozyten und die CD34 exprimierenden Zellen am volumetrischen Gerät quantifiziert.

### 3.2.6 Präparation

Eine Probe des Blutproduktes wurde auf verschiedene Weise für die 2PF-Messung und die volumetrische Messung vorbereitet (Abb. 4). Lediglich für den direkten Geräte- und Methodenvergleich (2-PF) wurde ein einheitliches Verfahren gewählt.

Zunächst wurde die Leukozytenzahl der Probe am HC analysiert. Parallel dazu erfolgte eine Leukozyten-Zählung mit Kernfärbung am V-DFZ. Für die Kernfärbung wurden 100µl Blutprodukt mit 9900µl CyStain-Lösung gemischt und sofort am V-DFZ unter Anregung einer Hb-Lampe fluoreszenzvolumetrisch gemessen. Die Signalverstärkung der Fluoreszenzsignale wurde dabei so gewählt, dass Zellen der G1-Phase im Kanal 200 eingeordnet wurden, Zellen der S- und anschließenden G2-Phase bzw. Doubletten befanden sich entsprechend in höheren Kanälen (Abb.5). Die Signale zwischen Kanal 50-600 wurden gezählt und zum Vergleich mit der Referenzmethode zur Leukozytenzählung (Hämatologiezählgerät) herangezogen.

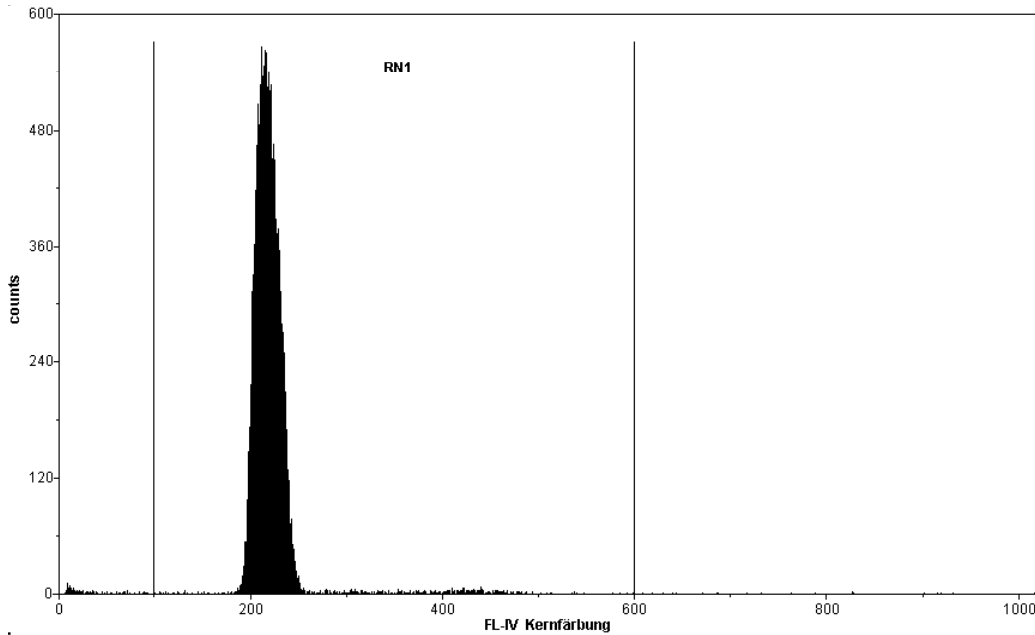


Abbildung 5: DNA-Messung am volumetrischen Zytometer (Kernfärbung).

Für die 2PF-Messungen wurden gemäß DGTI-Konsensus-Protokoll 50 $\mu$ l-Aliquots folgendermaßen vorbereitet:

Zu jeder Probe wurden jeweils 10 $\mu$ l CD34-PE und CD45-FITC Antikörper zugesetzt. Bei den Isotypkontrollen wurde statt CD34-PE ein PE-markierter anti-Maus-IgG-Antikörper verwendet. Die Proben wurden dann kurz auf mittlerer Stufe gemischt (Vortex) und für 15 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 1400 $\mu$ l Ortho mune-Lyse zugesetzt, wie zuvor gemischt, dann 5 Minuten auf niedriger Stufe zentrifugiert und invertiert. Das Pellet wurde in 1400 $\mu$ l PBS resuspendiert, nochmals 5 Minuten zentrifugiert und das Pellet für die Fluoreszenzmessung in 400 $\mu$ l (für das S-DFZ) bzw. 800 $\mu$ l (V-DFZ) PBS aufgenommen.

Für die volumetrischen CD34-Messungen am V-DFZ wurden 100 $\mu$ l-Aliquots der Blutproben mit verschiedenen Lysen versetzt. Für die volumetrischen Messungen war ein Verfahren ohne Waschschrte nötig.

Zunächst wurden die Proben mit je 20 $\mu$ l Antikörpern (CD34-PE bzw. Maus-IgG-PE als Isotypkontrolle und CD45-FITC) vermischt, die Inkubationen (15 Minuten bei Raumtemperatur) erfolgten stets im Dunkeln.

Die folgenden Lysen wurden nach Herstellerangaben, so weit für das no wash-Verfahren empfohlen, verwendet:

Ortho mune –Lyse [OD-L]

2000µl der Lyse wurden nach der Immunmarkierung der Probe zugefügt und nach dem Mischen 10 Minuten im Dunkeln lysiert, die Messung erfolgte innerhalb von 2 Stunden. Der für die volumetrischen Berechnungen relevante effektive Verdünnungsfaktor betrug 1: 21,4.

BD FACS –Lyse [BD-L]:

1800µl Lyse (1-fach) wurden der immunmarkierten Probe beigemischt; die Messung erfolgte nach höchstens 30 Minuten. Der Verdünnungsfaktor betrug 1:10,4.

DAKO Uti-Lyse [DA-L]:

Die immunmarkierte Probe wurde für 10 Minuten mit 100µl Reagenz A inkubiert, dann wurden 1000µl Reagenz B zugefügt, die Messung konnte anschließend nach Herstellerangaben im Abstand von 10 Minuten bis zu 24 Stunden erfolgen. Bei der volumetrischen Messung musste der Verdünnungsfaktor von 1:12,4 beachtet werden.

CyLyse [CY]:

Bei dieser Methode wurde die immunologisch gefärbte Probe vor der Lyse fixiert, hierzu wurden 100µl Lösung A zugefügt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 2000µl Lösung B zugefügt. Die Messung konnte nach über 30 Minuten bis zu 24 Stunden erfolgen. Die Verdünnung betrug 1:22,4.

Kernfärbung (KF):

Zusätzlich zu den immunologischen Untersuchungen wurde für eine Kernfärbung (KF) des lysierten Materials ein 100µl Aliquot entnommen, mit 900µl CyStain-Lösung versetzt und eine volumetrische Zählung (Hb-Lampen Anregung) der Partikel vorgenommen. Am selben Gerät (Laser-Modus) wurden die lysierten Proben volumengesteuert auf ihre Zahl an CD34<sup>+</sup> und CD45<sup>+</sup> Zellen untersucht, so dass die gemessenen Zahlenwerte und Volumina direkt vergleichbar waren.

### 3.2.7 Auswertung und statistische Methoden

Beide durchflusszytometrischen Geräte verfügen über leistungsfähige Software, die eine quantitative Auswertung unterstützt.

Die Auswertung erfolgte schrittweise nach dem DGTI/ DGHO-Konsensusprotokoll. In Abb. 6 lässt sich dieses Vorgehen nachvollziehen. Zunächst wurden im SSC/ CD45-dot-plot die CD45<sup>+</sup> Leukozyten eingegrenzt (Abb. 6, Region Q2). Dieses Auswertefenster wurde auf Die SSC/ CD34-Darstellung angewandt. Die CD34<sup>+</sup> Zellen mit niedrigem Signal im Seitwärtsscatter wurden in die FSC/ SSC-Darstellung kopiert; wenn sie dort eine geschlossene Population bildeten, wurden sie als hämatopoetische Progenitoren (HPC) angesehen (Region R1). Die Regionen wurden in die Diagramme der Negativkontrolle kopiert; wenn dort Signale denen der HPC entsprachen, wurden diese von denen der CD34-markierten Probe abgezogen.

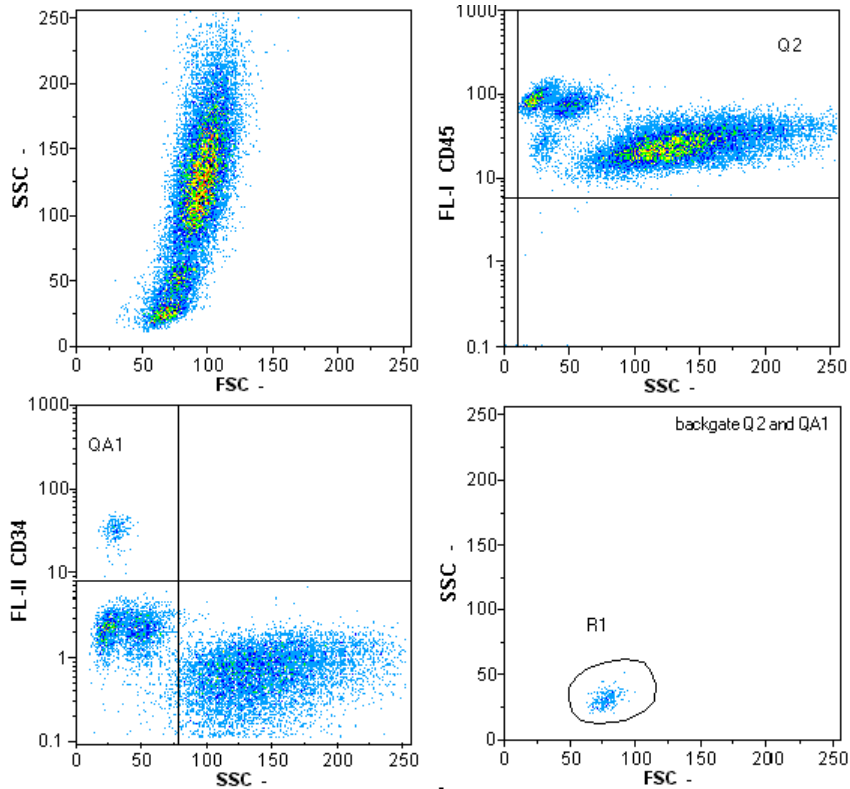


Abbildung 6: Gating Strategie.



Bei der 2PF-Messung wurde folgende Formel zur Bestimmung der absoluten CD34<sup>+</sup> Zahl angewandt:

Formel zur Absolutzahlbestimmung CD34<sup>+</sup> Zellen:

$$\text{CD34}^+/\mu\text{l} = \frac{(\text{CD34}^+ \text{ im Gate} - \text{Isotypkontrolle}) \times \text{Leukozytenzahl}/\mu\text{l}}{\text{CD45}^+ \text{ Zellen}}$$

Die Ergebnisse der einzelnen Messungen wurden in einer Microsoft-Excel 97 Datenmaske gesammelt, graphisch aufbereitet und mit dem Statistikprogramm SPSS (Version 10.0) ausgewertet.

Die Einflüsse der Präparationen wurden nach der Datensammlung hinsichtlich der Standardabweichung und Korrelation (nach Pearson) geprüft. Die Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon-Test (nichtparametrischer Zweistichprobentest für verbundene Stichproben) bei einem Niveau von  $p = 0,001$  geprüft. Nach der deskriptiven Methode von Bland und Altman<sup>79</sup> wurden die volumetrische Leukozytenmessung und 2PF-Messung am V-DFZ auf Übereinstimmung mit ihren Referenzen (HC, 2PF am S-DFZ) geprüft und graphisch dargestellt.

### 3.2.8 Ein- und Ausschlusskriterien

Folgende Ein- und Ausschlusskriterien wurden gewählt: Proben mit Leukozytenzahlen  $< 500/\mu\text{l}$  sollten am S-DFZ wegen der voraussichtlich minimalen Ausbeute nicht auf den Gehalt CD34<sup>+</sup> Zellen untersucht werden und konnten folglich auch nicht zum Methodenvergleich dienen. CD34<sup>+</sup> selektionierte Stammzellen sollten eine Reinheit von über 95% haben. Außerdem sollten die Proben bei Raumtemperatur und nicht länger als 12 Stunden gelagert sein.

## 4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss verschiedener Präparationen für die Bestimmung von Leukozyten und CD34<sup>+</sup> Zellen mit einem volumetrischen Messverfahren geklärt werden.

### 4.1 Präparationsbedingte Unterschiede

In den Dot-Plots in Abbildung 7 lässt sich die Beeinflussung der Darstellungen durch die vier verschiedenen Präparationen an einer repräsentativen Vollblutprobe (Patient 6) nachvollziehen.

In Fluoreszenz 1 [ FI-I ] sind die CD45-FITC markierten Zellen registriert, in Fluoreszenz 2 [ FI-II ] die CD34-PE markierten. Die Regionen wurden nach den ISHAGE-Prinzipien definiert.

Spalten 3-5 zeigen ungewaschene lysierte Proben nach Messung und Auswertung an der volumetrischen Plattform. Im FSC/ SSC-Scatter werden die Unterschiede, die die Präparationen auf das Quellen bzw. Schrumpfen der Zellen haben, deutlich.

Auch die Signalintensität in den Fluoreszenzen wird beeinflusst. Die BD-lysierten Proben (Spalte 4) sind trotz empfohlenem Protokoll (für die Präparation ohne Waschschrift) und regelrecht aufbewahrtem Reagenz nicht vollständig lysiert worden, so dass die Auswertung der Vollblutproben erschwert war.

Im Vergleich ist in Spalte 1 die nach der 2PF -Methode auszuwertende Probe am S-DFZ dargestellt. Im Vergleich zu den nicht gewaschenen Proben sind die Fluoreszenzcluster etwas leichter abgrenzbar. Dies gilt auch für die gleiche Präparation am V-DFZ (Spalte 2).



In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der volumetrischen und der 2PF-Messung für diese Probe exemplarisch aufgeführt.

Die größten Absolutzahlunterschiede zeigten sich zwischen 1PF- und 2PF-Methode, wobei der prozentuale CD34<sup>+</sup>-Anteil dabei relativ stabil bleibt.

| Geräte     | Präparation | CD45 <sup>+</sup> / $\mu$ l | CD34 <sup>+</sup> / $\mu$ l | CD34 <sup>+</sup> Anteil an CD45 <sup>+</sup> in % |
|------------|-------------|-----------------------------|-----------------------------|--|
| 2 PF S-DFZ | OD-LW       | 7500 Leukozyten/ $\mu$ l    | 172                         | 2,29   |
| 2 PF V-DFZ | OD-LW       | 7500 Leukozyten/ $\mu$ l    | 152                         | 2,03   |
| 1PF V-DFZ  | OD-L        | 5167                        | 108                         | 2,09   |
| 1PF V-DFZ  | BD-L        | 4622                        | 96                          | 2,08   |
| 1PF V-DFZ  | DA-L        | 4687                        | 88                          | 1,87   |
| 1PF V-DFZ  | CY-L        | 4935                        | 111                         | 2,25   |

Tabelle 2: Leukozyten und CD34-Zahlen (Patient 6).

Um zu klären, ob die Unterschiede zwischen 2PF und 1PF Bestimmung auf einem Systemfehler des V-DFZ beruhen, musste also zunächst untersucht werden, ob das V-DFZ in Bezug auf die Leukozytenzählung der Referenz des HC gleichwertig ist ( siehe Kapitel 4.2.1.).

Es wurden deshalb die 2PF-Modi beider Durchflusszytometer verglichen. In den folgenden Kapiteln werden die Beobachtungen bei der oben aufgeführten einzelnen Probe an statistisch auswertbaren Kollektiven beschrieben.

#### 4.2 Vergleich zweier Leukozytenzählmethoden

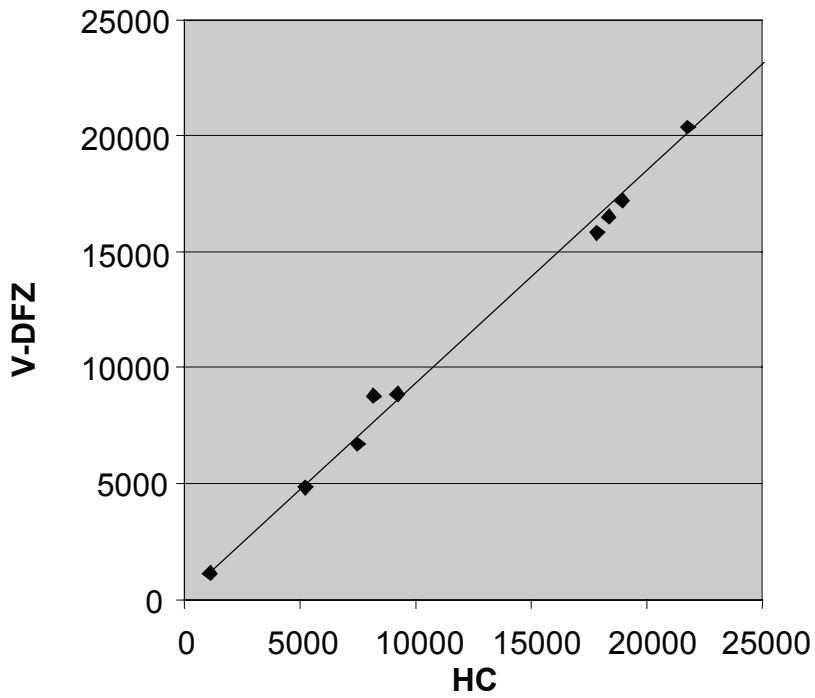
Die routinemäßige Bestimmung der Leukozytenzahl im hämatologischen Labor erfolgt mit dem Hämatologiezählgerät (HC). Diese in Multi-Center-Studien

getestete Methode gilt als Referenz für andere Zählverfahren. Die Leukozytenzählung mittels Kernfärbung am V-DFZ wurde mit diesem Verfahren verglichen.

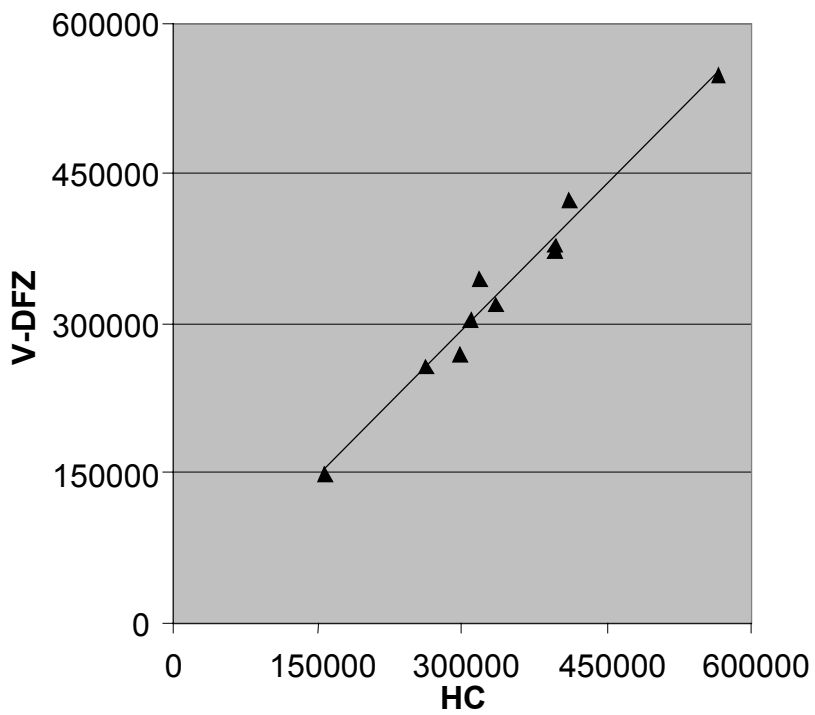
In Abbildung 8 sind die Leukozytenzahlen/ $\mu\text{l}$ , die für die einzelnen kerngefärbten Proben am V-DFZ ermittelt wurden, gegen die Ergebnisse des HC aufgetragen. Sowohl für Vollblut, als auch für Leukapherisat und CD34-aufgereinigte Produkte ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Techniken bei  $p=0,022$  (Wilcoxon-Test, Signifikanzniveau  $p=0,001$ ). Analysen nach Pearson ergaben Korrelationen der Messungen von  $r=0,998$  (Vollblut),  $r=0,998$  (Leukapherisat) und  $r=0,999$  (CD34 aufgereinigte Produkte).

Die deskriptive Bland-Altman Analyse zeigt, dass beide Techniken Werte lieferten, deren Differenzen gering waren und – bis auf eine Ausnahme bei den Leukaphereseprodukten – im Bereich von zwei Standardabweichungen vom Mittelwert der Differenzen streuten (Abb. 9). Der Mittelwert der Differenzen ist von der Nulllinie ins Positive verschoben (Bias der VB-Proben +943 Leukozyten/ $\mu\text{l}$ , Bias der LP-Proben +9708 Leukozyten/ $\mu\text{l}$ ) ; die Kernfärbung lieferte folglich für diese Versuchsreihe leicht niedrigere Werte als die HC-Messung, die wie oben beschrieben aber nicht im signifikanten Bereich lagen.

- Ergebnisse -



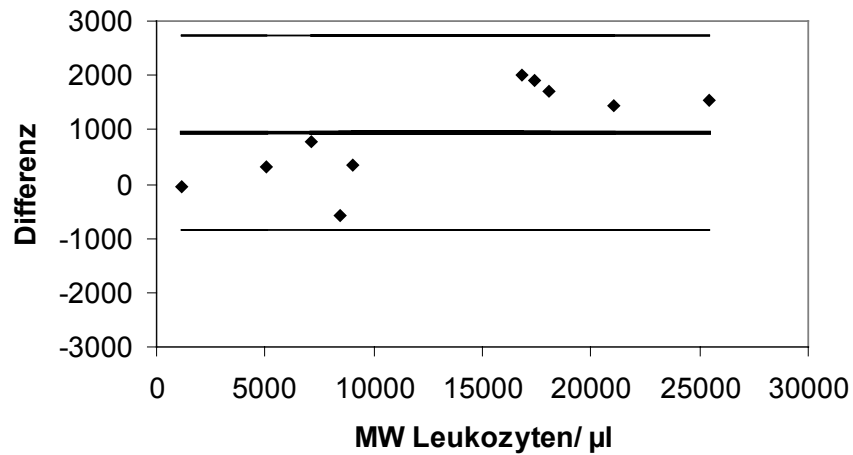
a)



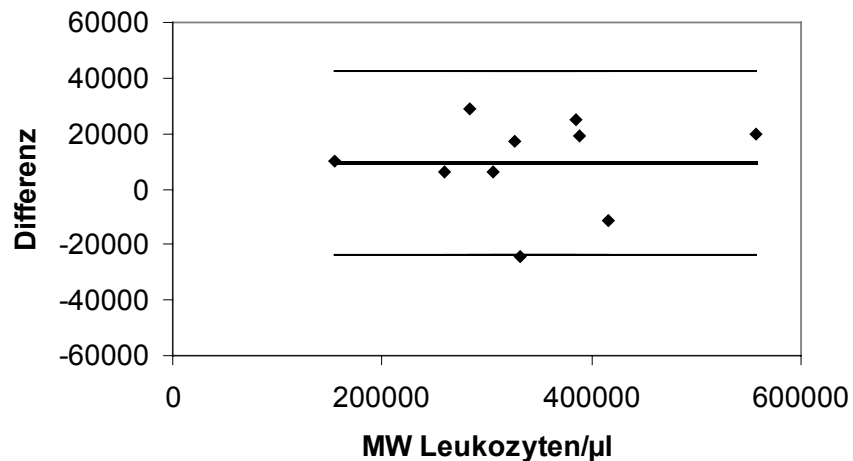
b)

Abbildung 8: Korrelation der Leukozytenbestimmung zwischen HC und Kernfärbung am V-DFZ.

a) Vollblutproben b) Leukapherisate.



a)



b)

Abbildung 9: Bland-Altman Analyse der Leukozytenzahlen. Ergebnisse der Kernfärbung am V-DFZ im Vergleich zur Referenzmethode (HC).

(a) Vollblutproben und (b) Leukapherisate.

#### 4.3 Vergleich der Zwei-Plattform Messungen des S-DFZ und des V-DFZ

Neben der direkten volumetrischen Quantifizierung der Leukozyten mit dem V-DFZ erlaubt dieses Gerät auch die Auswertung in Form einer 2PF-Messung. Damit lassen sich signal- und volumengesteuertes Gerät direkt miteinander vergleichen.

Der Vergleich zwischen den 2PF-Messungen beider Geräte ist in der folgenden Graphik (Abb. 10) dargestellt. Die am volumetrischen Zytometer und am S-DFZ bei gleicher Präparation (OD-LW) gewonnenen Werte für CD34<sup>+</sup> Zellen wurden miteinander verglichen. Sowohl für Vollblut, als auch für Leukapherisate und CD34-aufgereinigte Proben ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Geräten bei  $p=0,779$  (Wilcoxon-Test). Die Analysen nach Pearson ergaben Korrelationen der Messungen von  $r= 0,997$ (Vollblut),  $r=0,998$  (Leukapherisate) und  $r=0,99$  (CD34<sup>+</sup> selektionierte Produkte).

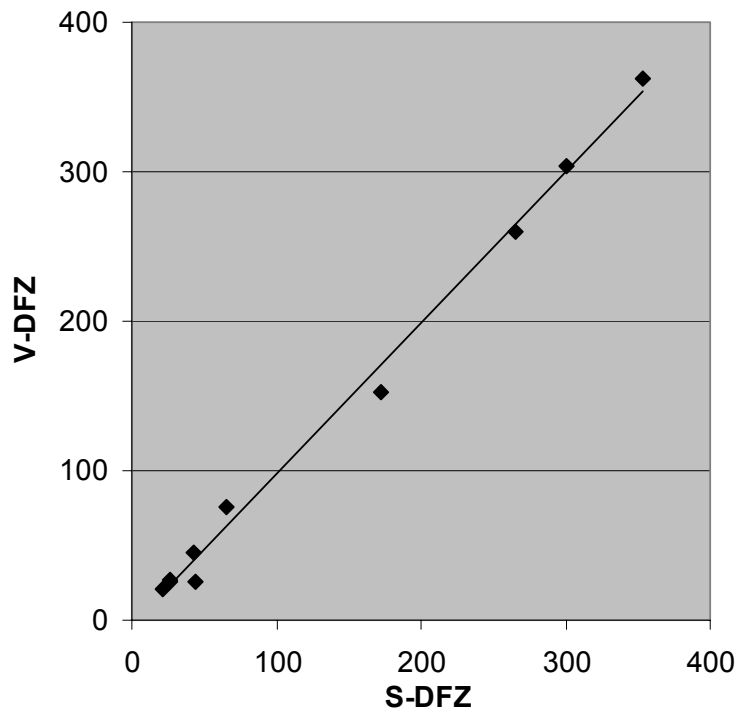
Auch die Bland-Altman Analyse (Abb. 11) zeigt, dass die Ergebnisse der 2PF-Messungen beider Geräte nur geringe Differenzen lieferten und im Bereich von zwei Standardabweichungen vom Mittelwert der Differenzen streuten. Der Bias bei den VB-Proben war  $+2$  CD34<sup>+</sup>/ $\mu$ l, bei den LP-Proben  $-239$  CD34<sup>+</sup>/ $\mu$ l.

Die Abgleichung des V-DFZ mit dem HC und S-DFZ ist wichtig als Basis für die Lysevergleiche. Die volumetrische Einheit wurde hierbei über den Vergleich mit dem HC auf ihre Richtigkeit geprüft, die Bestimmung immunmarkierter Zellen über den Vergleich der 2PF-Modi beider Geräte.

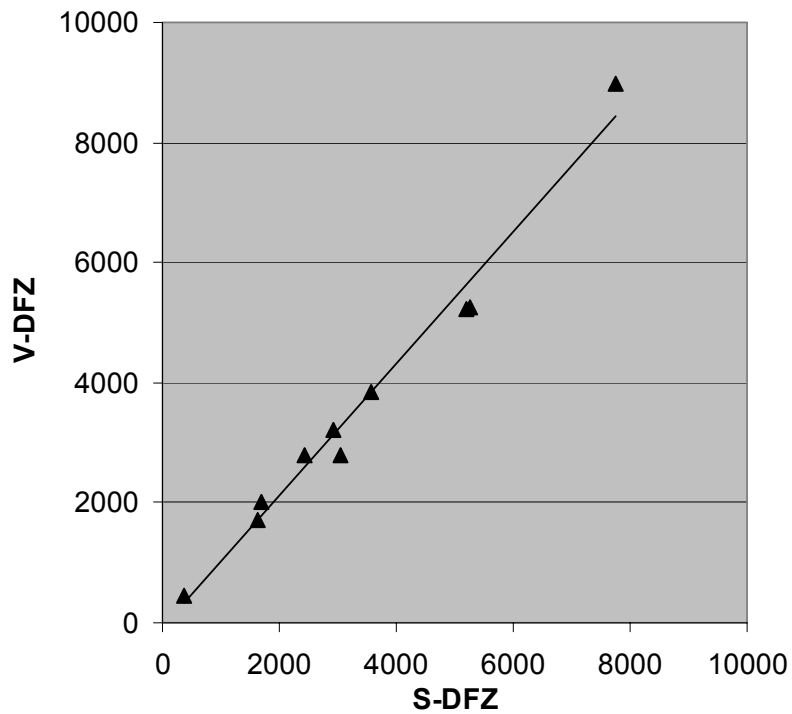
Es wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die weiteren Unterschiede somit präparationsbedingt sein müssen.



– Ergebnisse –



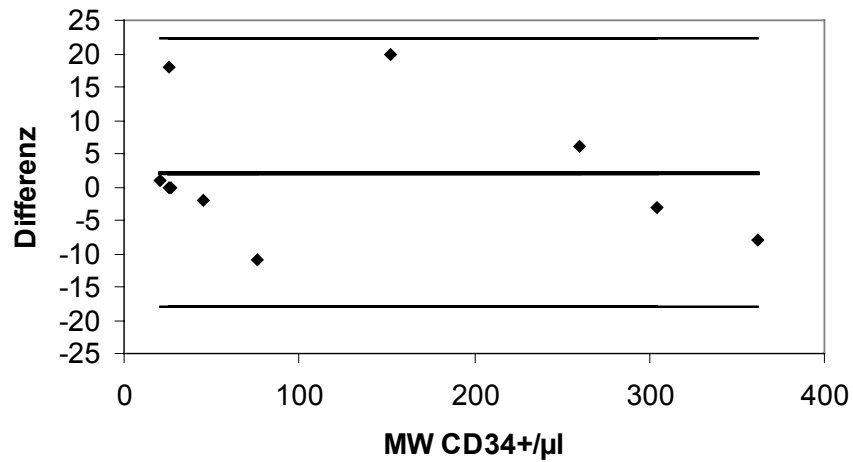
a)



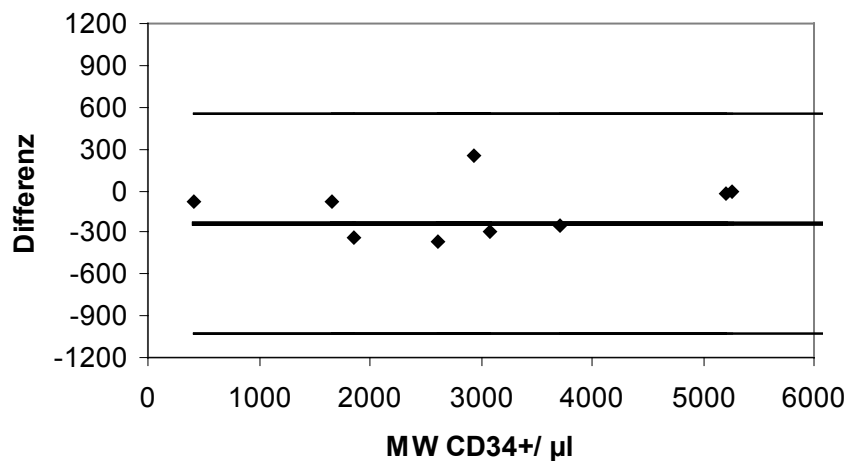
b)

Abbildung 10: Korrelationen der CD34<sup>+</sup>-Bestimmung zwischen S-DFZ und V-DFZ (Auswertung nach der 2PF-Methode).

a) Vollblutproben b) Leukapherisate.



a)



b)

Abbildung 11: Bland-Altman Analyse der CD34<sup>+</sup>-Zahlen. Vergleich des Zwei-Plattform Modus des V-DFZ mit der Referenz des S-DFZ.

(a) Vollblutproben (b) Leukapherisate.

Im Folgenden sind diese Präparationsunterschiede systematisch an entsprechenden Proben untersucht worden.

#### 4.4 Vergleich von Erythrozytenlyseverfahren am V-DFZ

Am volumengesteuerten Durchflusszytometer (V-DFZ) wurden die Einflüsse vier verschiedener Erythrozytenlysen auf die CD45<sup>+</sup>- und CD34<sup>+</sup>-Zellzahlen untersucht. Die Zellzahlen wurden dabei unter Einbeziehung des effektiven Verdünnungsfaktors ermittelt.

Die Einwirkung von CyLyse auf die citrathaltigen Leukaphereseprodukte und CD34-aufgereinigten Zellen führte dazu, dass die immunmarkierten Proben im Scatterbild nicht mehr auswertbar waren; die Partikel zeigten keine typischen Struktur- und Fluoreszenzsignale mehr. Bei den mit EDTA antikoagulierten Vollblutproben zeigte sich dieser Effekt nicht, sie waren auf herkömmliche Art auswertbar. Bei den anderen Lyseprotokollen waren keine Probleme im Zusammenhang mit citrathaltigen Produkten nachweisbar. Nach dem vom Hersteller empfohlenen BD-L Protokoll für ungewaschene Proben trat in einigen Fällen eine unvollständige Erythrozytenlyse auf. Dies führte dazu, dass eine Vollblutprobe (Patient 3) auch nach wiederholtem Ansatz unter dieser Präparation nicht auswertbar war.

In den folgenden Darstellungen wurden die Werte des HC bzw. der 2PF-Messung am S-DFZ als Goldstandards gleich 100% gesetzt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen.

##### 4.4.1 Leukozytenzahlen in Vollblutproben

In Abbildung 12 sind die Ergebnisse der CD45<sup>+</sup>-Messung in lysiertem mobilisiertem Vollblut (n=10) wiedergegeben. Die Darstellung erfolgte im Vergleich zur Referenzmethode (HC). Parallel dazu wurden die gleichen Proben volumetrisch mittels Kernfärbung gezählt. Zwischen Hämatologiezählgerät und volumetrischem Verfahren bestand kein signifikanter Unterschied (p=0,022). Am gleichen volumetrischen Gerät waren jedoch bei

allen lysierten immunmarkierten Vollblutproben signifikante Differenzen der CD45<sup>+</sup>-Werte zu der Referenz des Hämatologiezählgerätes [HC] (s. Abb.) festzustellen. Am HC wurden im Mittel 13430 (±8213) Leukozyten gezählt, am volumetrischen Zytometer an den gleichen Proben 9268 (±5832) CD45<sup>+</sup> /µl [OD-L] 7111 (±4438) CD45<sup>+</sup> /µl [BD-L], 8102 (±5083) CD45<sup>+</sup> /µl [DA-L] und 9569 (±6193) CD45<sup>+</sup> /µl [CY-L].

Die Abnahme betrug somit 28% [OD-L], 38% [BD-L], 39% [DA-L] und 29% [CY-L].

Zwischen den einzelnen Präparationen bestanden in dieser Versuchsreihe Unterschiede, die nicht im signifikanten Bereich liegen (Signifikanzniveau p= 0,05).

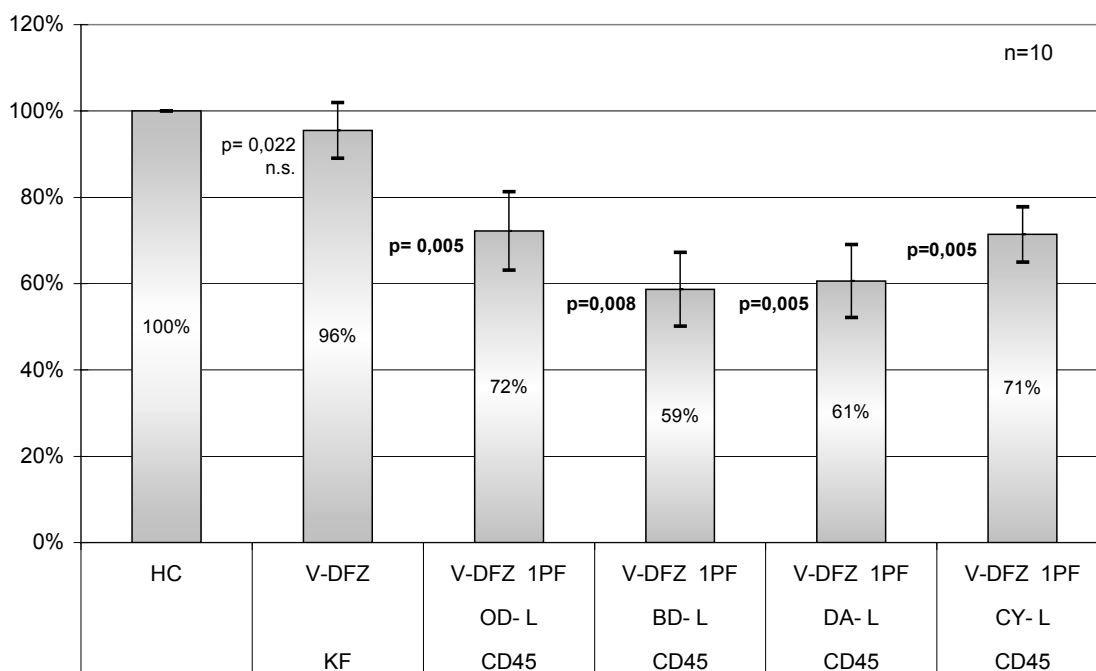


Abbildung 12: Leukozytenzahl ( CD45<sup>+</sup> Zellen) im Vollblut.

Die BD lysierten Proben zeigen trotz größerer Differenz zum Leukozytenstandard am HC nur eine geringere Signifikanz, weil sich eine Probe (Patient 3) lysebedingt nicht auswertbar zeigte (daher im Wilcoxon-Test n=9).

Die einzelnen Methoden korrelieren hoch mit der Referenzmethode (HC) r [OD-L] = 0,990, r [BD-L] =0,978 , r[DA-L]= 0,952, r[CY-L]= 0,986 ; die alleinige

Angabe der Korrelationen ergibt jedoch keinen Hinweis auf Leukozytenverluste, weil die Korrelationsanalyse allein keine Angaben über die Richtigkeit einer Messung zulässt.

#### 4.4.2 Leukozytenzahlen in Aphereseprodukten

Die folgende Abbildung 13 beschreibt die Messung der gleichen Parameter in Leukaphereseprodukten (n=10). Im Vergleich zur Referenz des Hämatologiezählgerätes zeigten sich auch bei den insgesamt höheren Leukozytenwerten (MW 345750 / $\mu$ l in der HC-Messung) und der anderen Probenzusammensetzung keine signifikanten Unterschiede zur volumetrischen Messung mittels Kernfärbung (p=0,022). Wiederum ließen sich am gleichen volumetrischen Gerät signifikante Unterschiede der CD45<sup>+</sup>-Werte sowohl zu der Referenz des Hämatologiezählgerätes als auch zu der Kernfärbung feststellen. Am HC wurden durchschnittlich 345750 ( $\pm$ 107878) Leukozyten bestimmt, am volumetrischen Zytometer an den gleichen Proben nur 225184 ( $\pm$ 74189) CD45<sup>+</sup> / $\mu$ l [OD-L], 229649 ( $\pm$ 71853) CD45<sup>+</sup> / $\mu$ l [BD-L] und 219845 ( $\pm$ 67767) CD45<sup>+</sup> / $\mu$ l [DA-L]. Die Verluste lagen bei 34% [OD-L], 33% [BD-L] und 36% [DA-L]. Demzufolge führten alle Lyseprotokolle zu einem großen Zellverlust.

Zwischen den einzelnen Präparationen der CD34-markierten Proben bestanden allerdings wie bei den Vollblutproben keine signifikanten Unterschiede (Signifikanzniveau p= 0,05).

Auch bei den Leukaphereseprodukten zeigten sich trotz der signifikanten Unterschiede zwischen der 1PF- und der Referenzmethode (HC) sehr hohe Korrelationen zwischen der Referenz und der 1PF-Methode unter den verschiedenen Lysepräparationen: r [OD-L] = 0,947, r [BD-L] = 0,956 , r[DA-L]= 0,999.

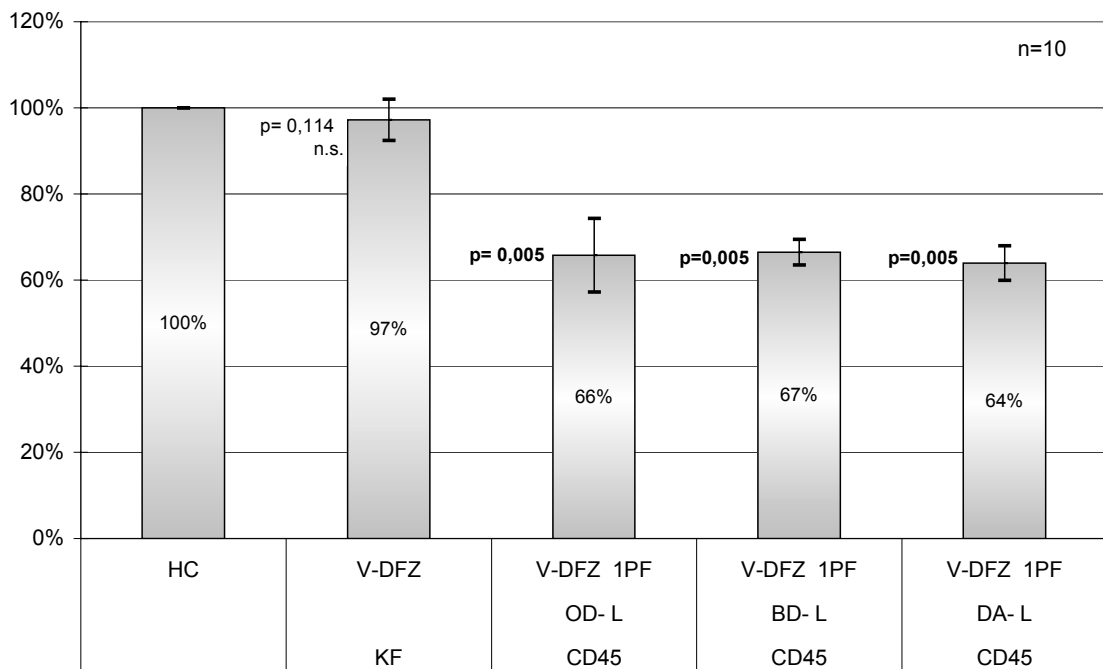


Abbildung 13: Leukozyten/ CD45<sup>+</sup> Zellen in Leukaphereseprodukten.

#### 4.4.3 CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen in Vollblutproben

Die oben beschriebenen CD45-Messungen dienen im Falle der 2PF-Methode als Basis für die Bestimmung der CD34<sup>+</sup> Ereignisse. Die volumetrische Quantifizierung dieser Zellen kann jedoch unabhängig von der CD45-Messung erfolgen.

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse der CD34<sup>+</sup>-Messung in mobilisiertem Vollblut (n=10) dargestellt. Zwischen den 2PF Ergebnissen mit der S-DFZ bzw. V-DFZ zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (p=0,022). Am gleichen volumengesteuerten Gerät jedoch wurden bei allen lysierten immunmarkierten Vollblutproben signifikante Differenzen der CD34<sup>+</sup> Zahlen zu den – in gleicher Weise gegateten – errechneten 2PF Werten sichtbar (s. Abb.14). Für die S-DFZ/ HC 2PF-Messung wurde im Mittel die Absolutzahl von 132 (±130) CD34<sup>+</sup>/µl errechnet, am volumetrischen Zytometer (1PF) an den gleichen Proben nur 77 (±75) CD34<sup>+</sup>/µl [OD-L], 60 (±63) CD34<sup>+</sup>/µl [BD-L], 72 (±72) CD34<sup>+</sup>/µl [DA-L] und 86 (±84) CD34<sup>+</sup>/µl [CY-L]. Die Abnahme betrug somit im

Mittel 40% [OD-L], 43% [BD-L], 45% [DA-L] und 34% [CY-L]. Die großen Standardabweichungen bei den Absolutzahlen waren durch die großen Unterschiede der CD34-Zellzahlen im Probenkollektiv (Min. 22 CD34<sup>+</sup>/µl; Max. 356 CD34<sup>+</sup>/µl bei der Referenzmethode) bedingt.

Demzufolge lassen sich auch bei den hämatopoetischen Progenitorzellen die bei den CD45<sup>+</sup> Leukozyten beschriebenen Zellverluste in ähnlicher prozentualer Größenordnung nachweisen.

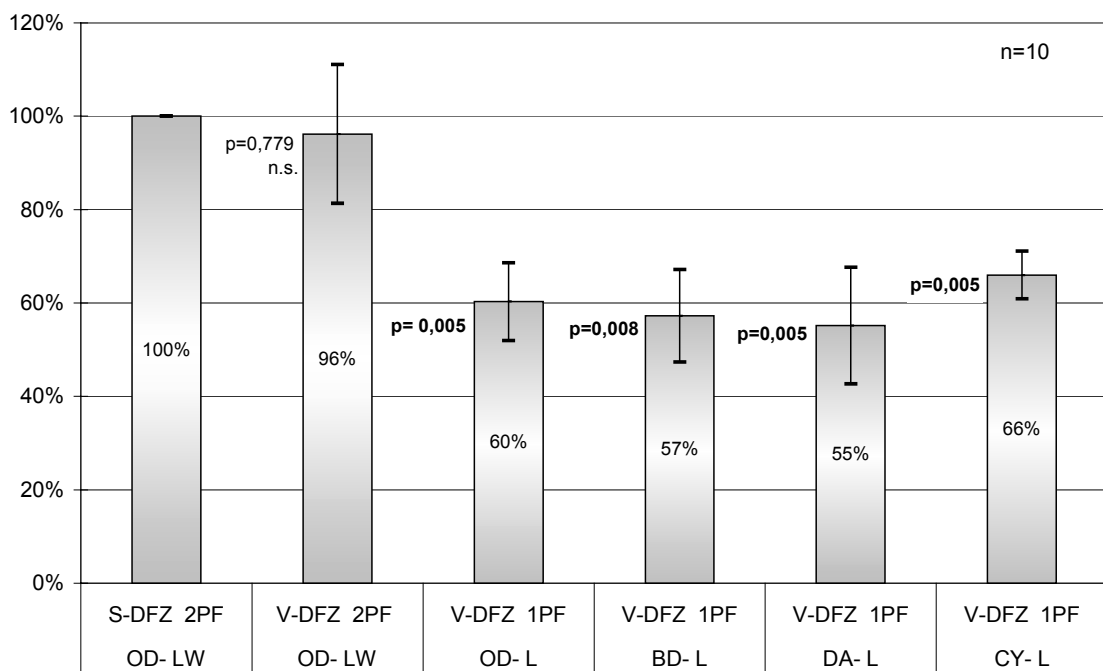


Abbildung 14: CD34<sup>+</sup> in Vollblutproben.

Zwischen den einzelnen Präparationen [OD-L, BD-L, DA-L, CY-L] bestanden in dieser Versuchsreihe für die CD34<sup>+</sup>-Zahlen keine signifikanten Unterschiede, (Signifikanzniveau p= 0,05).

Die Methoden zur volumetrischen CD34-Messung korrelierten ebenfalls hoch mit der 2PF-Messung [S-DFZ/ HC]: r [OD-L] = 0,996, r [BD-L] =0,993 , r[DA-L]= 0,991, r[CY-L]= 0,999.

#### 4.4.4 CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen in Leukaphereseprodukten

Für die Leukaphereseprodukte zeigten sich vergleichbare Ergebnisse (Abb. 15). Die Abnahme der CD34<sup>+</sup>-Zahlen bei den einzelnen Präparationen lag bei 45% [OD-L], 47% [BD-L] bzw. 46% [DA-L]. Die Mittelwerte der bestimmten CD34<sup>+</sup> Zellen betragen: 3389 ( $\pm$ 2167) CD34<sup>+</sup>/ $\mu$ l bei der 2PF-Messung, 1749 ( $\pm$ 1002) CD34<sup>+</sup>/ $\mu$ l [OD-L], 1781 ( $\pm$ 1109) CD34<sup>+</sup>/ $\mu$ l [BD-L], und 1806 ( $\pm$ 1161) CD34<sup>+</sup>/ $\mu$ l [DA-L]. Wie in der Abbildung dargestellt waren diese Differenzen zur Referenzmethode (S-DFZ/ HC) signifikant. Beide Durchflusszytometer lieferten mit der 2PF-Messung keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse. Auch bei den CD34<sup>+</sup>-Zellzählungen in Leukaphereseprodukten zeigten sich hohe Korrelationen mit der Referenzmethode [S-DFZ/HC]: r [OD-L] = 0,927, r[BD-L] = 0,993, r[DA-L] = 0,989.

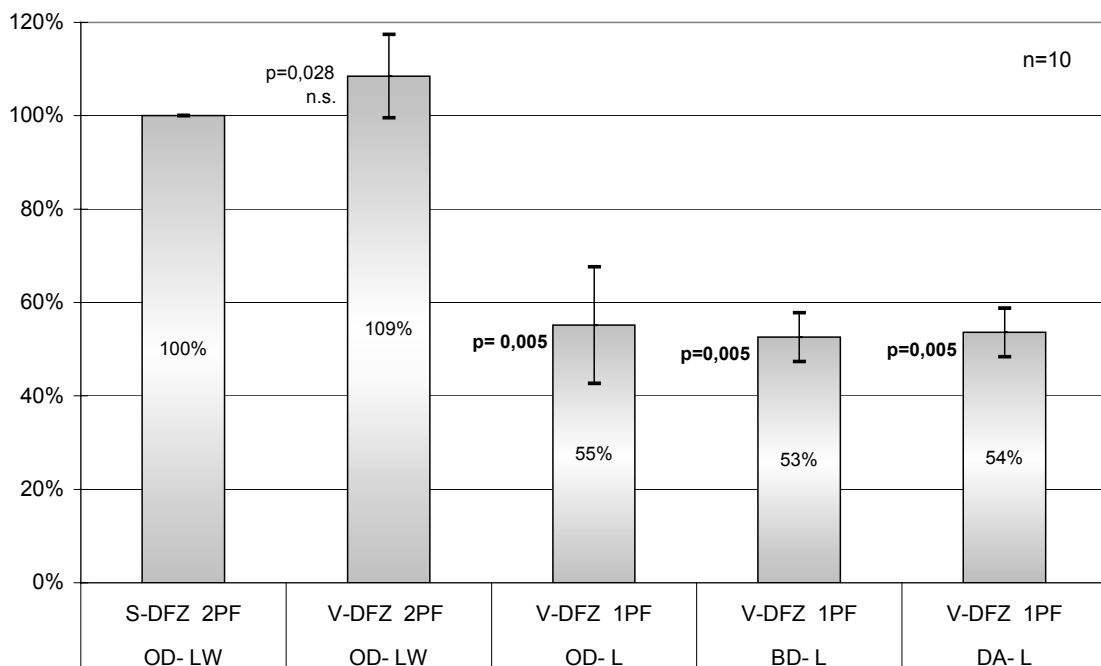


Abbildung 15: CD34<sup>+</sup> Zellen in Leukaphereseprodukten.



#### 4.4.5 Zellzahlen in CD34-aufgereinigten Proben

Um zu prüfen, ob sich diese Unterschiede auch selektiv an reinen CD34<sup>+</sup> Stammzellen zeigen, wurden in dieser Versuchsreihe die Einflüsse der Methode und der Präparation auf hochreine CD34<sup>+</sup> Stammzellen (Reinheit 99,7 ± 0,7 % ermittelt mit der Standardmethode S-DFZ/ HC) analysiert (Abb. 16).

Die Leukozytenzahl/ µl entsprach somit nahezu der CD34<sup>+</sup>/µl.

Das volumetrische Zytometer lieferte mit 6829 (± 2154) CD34<sup>+</sup>/µl für die 2PF-Messung keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich zum S-DFZ mit 6813 (± 2178) CD34/µl . Bei der volumetrischen Messung der Proben ergaben sich bei den verschiedenen Präparationen folgende CD34-Absolutzahlen: 4547 (±1528) CD34<sup>+</sup>/µl [OD-L], 4531 (±1318) CD34<sup>+</sup>/µl [BD-L], und 4297 (±1262) CD34<sup>+</sup>/µl [DA-L]. Das bedeutete eine Abnahme von 34% [OD-L], 33% [BD-L] bzw. 36% [DA-L] im Vergleich mit der Standardmethode. Es zeigten sich hohe Korrelationen mit der 2PF-Referenzmethode [S-DFZ/ HC]: r [OD-L] = 0,949, r[BD-L] =0,955 , r[DA-L]= 0,999. Demzufolge ist der signifikante Zellverlust auch selektiv für CD34<sup>+</sup> Zellen nachweisbar.

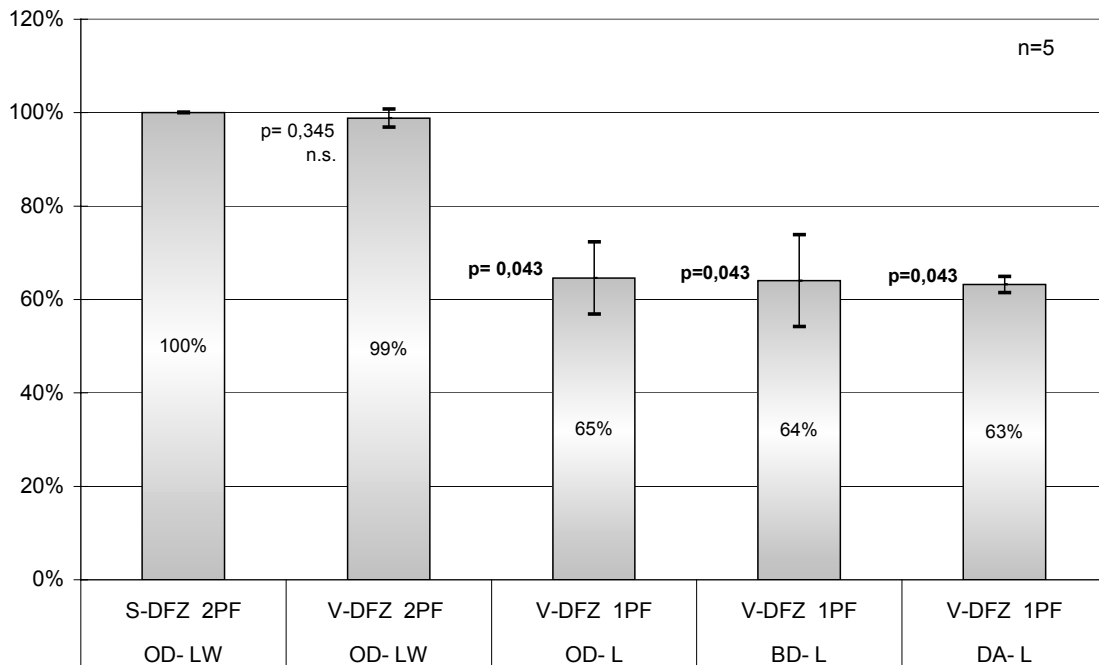


Abbildung 16: CD34<sup>+</sup> Zellen in hochreinen CD34-selektionierten Produkten.

#### 4.4.6 Lyseeinflüsse auf den relativen Anteil der CD34<sup>+</sup> Zellen

Die Prozentanteile der CD34<sup>+</sup> Zellen an den CD45<sup>+</sup> Leukozyten (s. Tab. 3) boten in dieser Versuchsreihe bei allen untersuchten Leukaphereseprodukten und Vollblutproben über die verschiedenen Präparationen nur einen leichten Abfall im Vergleich zur Referenzmethode [S-DFZ, gewaschene Proben] (keine signifikanten Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p=0,001$ ), so dass sich hier durch das Anwenden der Zwei-Plattform-Methode ebenfalls keine signifikanten Unterschiede für die CD34<sup>+</sup>-Zellzahlen ergaben. Die Leukaphereseprodukte und CD34-aufgereinigten Produkte (citrathaltig) waren mit der CyLyse-Präparation nicht auswertbar.

Die durchflusszytometrischen Methoden (1PF, 2PF) zeigen zwar eine hohe Korrelation, die Richtigkeit der Bestimmung der absoluten Leukozytenzahl und CD34<sup>+</sup> Zellzahl muss aber aufgrund des signifikanten Präparationseinflusses angezweifelt werden.

|        | 2PF<br>S-DFZ<br>OD-LW | 2PF<br>V-DFZ<br>OD-LW     | 1PF<br>V-DFZ<br>OD-L      | 1PF<br>V-DFZ<br>BD-L      | 1PF<br>V-DFZ<br>DA-L      | 1PF<br>V-DFZ<br>CY-L     |
|--------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| VB     | 1,37(± 1,54)          | 1,33 (± 1,49)<br>r= 0,999 | 1,18 (± 1,32)<br>r= 0,997 | 1,34 (± 1,66)<br>r= 0,997 | 1,28 (± 1,43)<br>r= 0,996 | 1,27 (± 1,43)<br>r=0,997 |
| LP     | 1,03 (± 0,58)         | 1,12 (± 0,58)<br>r= 0,996 | 0,83 (± 0,58)<br>r= 0,976 | 0,82 (± 0,58)<br>r=0,998  | 0,86 (± 0,58)<br>r=0,996  | /                        |
| CD34/P | 99,1 (± 0,7)          | 97,1(± 3,2 )<br>r= 0,999  | 97,8 (± 2,0)<br>r= 0,997  | 97,6 (± 1,7)<br>r= 0,997  | 97,2 (± 1,5)<br>r= 0,999  | /                        |

Tabelle 3: Anteil der CD34<sup>+</sup> Zellen an den CD45<sup>+</sup> Leukozyten in % und die Korrelation (r) im Vergleich mit der Standardmethode.

#### 4.5 Kernfärbung nach den Erythrozytenlysen

Um zu überprüfen, ob die niedrigere Leukozytenzahl nach der Erythrozytenlyse auch mittels Leukozytenzählung über Kernfärbung nachzuvollziehen war, wurde eine Kernfärbung der lysierten und immunmarkierten Proben durchgeführt.

Dabei war allerdings keine signifikante Abnahme der Partikelzahl im Vergleich zur Kernfärbung der Proben ohne weitere Präparation feststellbar.

In den folgenden Abbildungen ist dies für die Vollblutproben (Abb. 17) und die Leukaphereseprodukte (Abb. 18) dargestellt. Die Signifikanzen sind in Bezug auf die Kernfärbung der Vollblutproben (bzw. Leukaphereseprodukte) ohne weitere Präparation angegeben. Der Standard für die Leukozytenquantifizierung (Hämatologiezählgerät HC) wurde als 100% definiert. Die Mittelwerte der Absolutzahl/ $\mu\text{l}$  ( $\pm$  Standardabweichung) betragen für die Vollblute  $13430 \pm 7791/\mu\text{l}$  [HC],  $12487 (\pm 7116 /\mu\text{l})$  [KF Vollblut],  $12287 (\pm 8550/\mu\text{l})$  [OD-L und KF],  $11966 (\pm 7823 /\mu\text{l})$  [BD-L und KF],  $11076 (\pm 8122 /\mu\text{l})$  [DA-L und KF],  $11613 (\pm 7137 /\mu\text{l})$  [CY-L und KF].

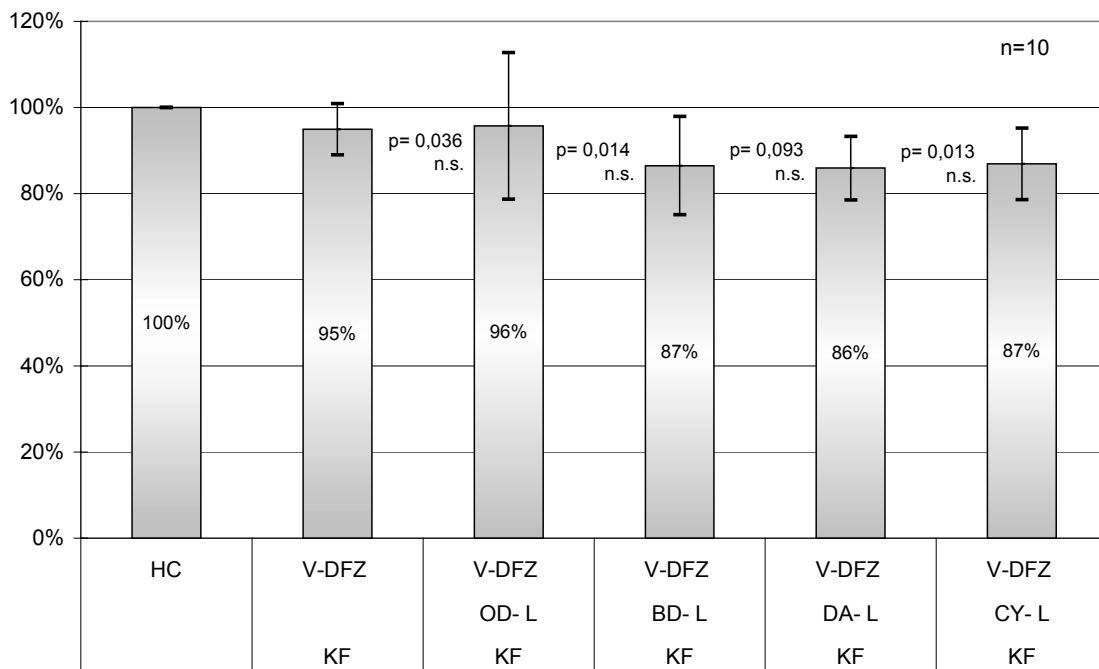


Abbildung 17: Kernfärbung von Leukozyten (Vollblut).

Die vergleichbaren Werte bei den Leukaphereseprodukten ( $345700 \pm 102317/\mu\text{l}$  [HC]) waren (s. auch Abb. 18):  $336079 (\pm 101218)/\mu\text{l}$  [KF des Produkts],  $325045 (\pm 116617)/\mu\text{l}$  [OD-L und KF],  $279846 (\pm 100622)/\mu\text{l}$  [BD-L und KF],  $312521 (\pm 94155)/\mu\text{l}$  [DA-L und KF],  $268023 (\pm 120467)/\mu\text{l}$  [CY-L und KF].

Die CyLyse lysierten Leukapherisate waren dabei dieselben, die wie oben dargestellt fluoreszenzzytometrisch nicht auswertbar waren, auch in der Kernfärbung zeigten die Proben ein Scatterbild mit einem hohem Debrisanteil. Der gleiche Versuch bei den CD34 aufgereinigten Produkten ergab im Vergleich zum HC [100%]: 97% [KF Vollblut], 78% [OD-L und KF], 109% [BD-L und KF] und 117% [DA-L und KF]; die CyLyse Proben waren nicht regelrecht auswertbar.

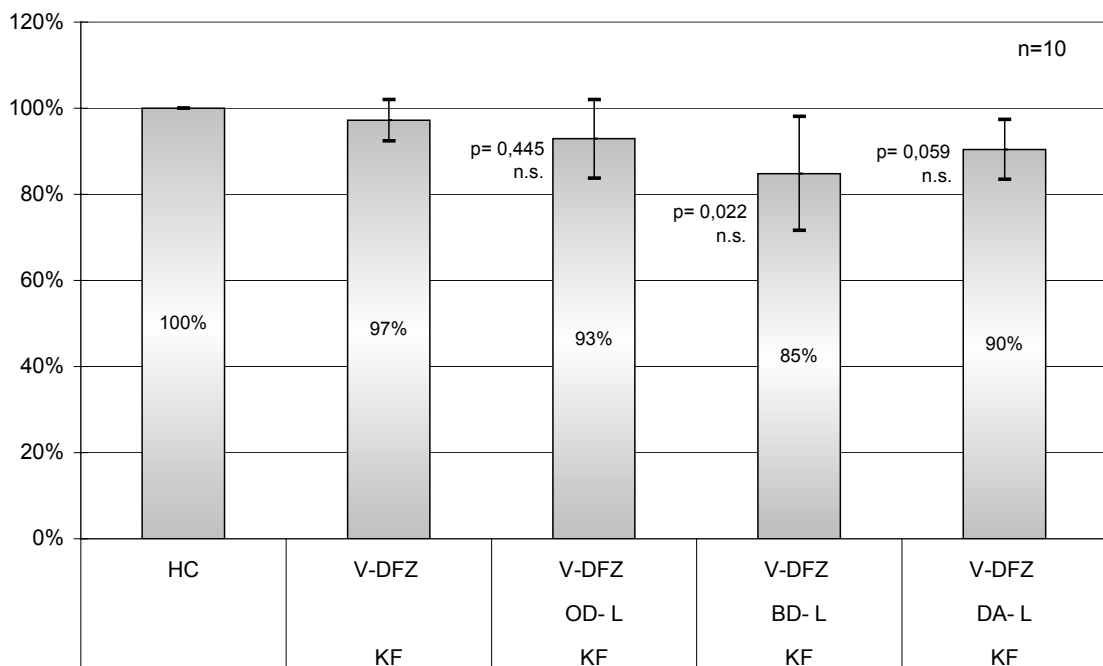


Abbildung 18: Kernfärbung von Leukozyten (Leukaphereseprodukte).

#### 4.6 Vergleich der Lyseverluste bei CD34<sup>+</sup> und CD45<sup>+</sup> Zellen

Es wurde untersucht, ob sich die Verluste an CD34<sup>+</sup> und CD45<sup>+</sup> Zellen bei identischen Proben unterscheiden.

Bei den CD45-markierten Leukozyten betrug die Verluste zwischen 28% und 34%, während bei den CD34-markierten Zellen zwischen 35% und 45% Verluste feststellbar waren. Die Unterschiede zwischen den Prozentverlusten der CD45<sup>+</sup> und CD34<sup>+</sup> Zellen waren jeweils signifikant.

Auch bei den anderen Lysen bestanden Unterschiede in den Verlusten der verschiedenen Leukozytensubpopulationen. So waren bei der BD-L und DA-L Präparation (Leukapherisatproben) signifikant unterschiedliche Verluste zwischen der CD45<sup>+</sup> (33% bzw. 36%) und CD34<sup>+</sup> (47% bzw. 46%) Leukozytenpopulation zu verzeichnen.

Auch bei den CY-L präparierten Vollblutproben waren die Verluste mit 29% (CD45<sup>+</sup> Zellen) und 34% (CD34<sup>+</sup> Zellen) signifikant unterschiedlich.

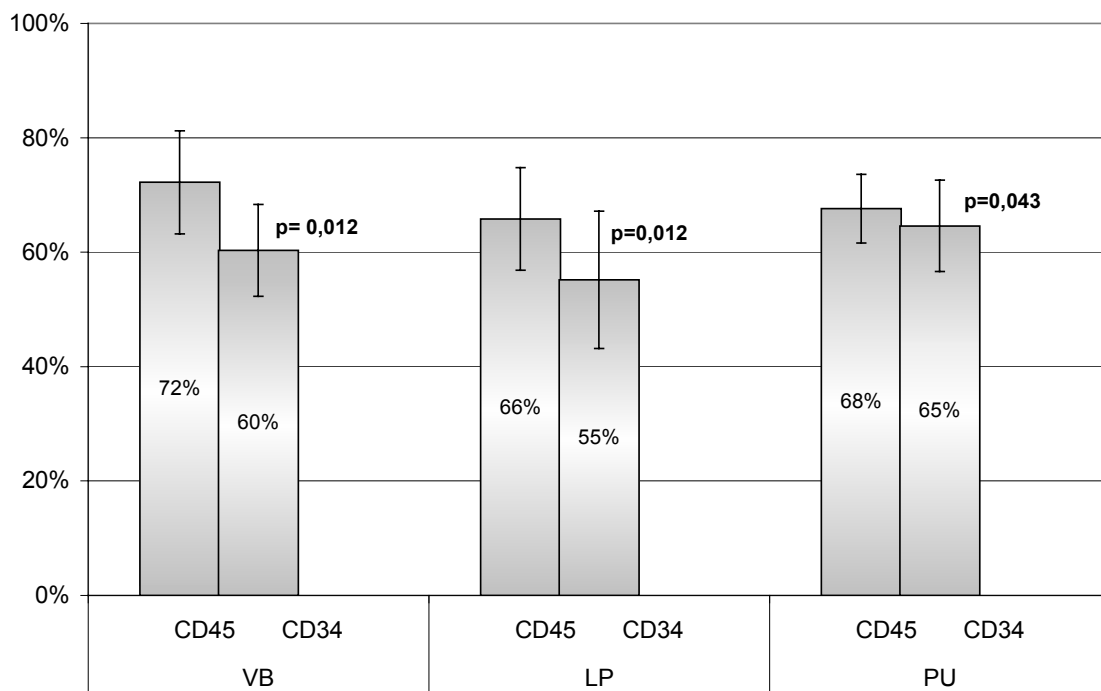


Abbildung 19: Selektive Einflüsse der OD-L Präparation.

Diese Entdeckung der individuellen Einflüsse von Erythrozytenlysen auf leukozytäre Subpopulationen mittels des V-DFZ hat besonders für die 2PF-Messung von hämatopoetischen Stammzellen eine große praktische Bedeutung. Bei der Berechnung der Absolutzahl CD34<sup>+</sup> Zellen mittels 2PF-Protokoll kann eine solch unterschiedliche Empfindlichkeit technikbedingt de facto gar nicht entdeckt und berücksichtigt werden.

## 5 Diskussion

Im Rahmen der wachsenden Bedeutung der Stammzelltransplantation ist eine zuverlässige Charakterisierung und Quantifizierung von Progenitorzellen unverzichtbar. Da die Qualität eines Transplantats wesentlich von der Stammzellzahl abhängt, ist die korrekte Bestimmung der CD34<sup>+</sup> Zellen von zentraler Bedeutung.

Die Quantifizierung erfolgt über spezifische immunologische Marker, die chemisch mit einem fluorszierenden Farbstoff verbunden sind. Diese Sonden binden an das progenitorzellspezifische CD34-Antigen und ermöglichen so die Messung der Zellen im Durchflusszytometer.

Grundsätzlich existieren drei verschiedene durchflusszytometrische Messverfahren zur Quantifizierung dieser immunmarkierten Zellen. Eine weit verbreitete Methode, die in diesem Zusammenhang auch als Referenzmethode gewählt wurde, ist die 2PF-Technik, bei der der relative Anteil der CD34<sup>+</sup> Zellen zu der CD45<sup>+</sup> exprimierenden Leukozytenfraktion in Beziehung gesetzt wird. In einem weiteren Schritt wird die absolute Zahl an CD34<sup>+</sup> Zellen über ein Hämatologiezählgerät (HC) ermittelt. Bei der zweiten Methode handelt es sich ebenfalls um eine relative Messung. Hier werden CD34<sup>+</sup> Zellen über eine bekannte Zahl von Referenzpartikeln quantifiziert. Die dritte, hier untersuchte, Vergleichsmethode ist eine durchflussvolumetrische Messung, welche eine direkte Konzentrationsbestimmung im bekannten Volumen erlaubt.

Ein großer Einflussfaktor bei allen hier aufgeführten Strategien ist die Erythrozytenlyse, die schon in früheren Publikationen als kritisch bewertet wurde und im Fall des Stammzellnachweises im Nabelschnurblut nach Cassens et al. (1998) in Einzelfällen bis zu 100% Abweichungen zeigte.<sup>45</sup> Trotz der schon lange diskutierten Fehlbestimmung von CD34<sup>+</sup> Zellen bei der Verwendung von Erythrozytenlysen gab es bislang noch keine systematische Untersuchung bezüglich der Quantifizierung von Lyseeffekten auf periphere Blutstammzellen und Leukozyten. Mit der hier dargestellten Methode – der

volumengesteuerten durchflussvolumetrischen Zählung – war es erstmals möglich, die Lyseverluste quantitativ eindeutig zu erfassen.

Als weiterer Einflussfaktor auf die Stammzellzählung muss die Waschung der Zellen berücksichtigt werden. Insbesondere für die volumetrische Zellzählung dürfen die Zellen nicht gewaschen werden, weil durch die Zentrifugations- und Waschprozesse Zellen beim Pelletieren zerstört bzw. entfernt werden und der Volumenbezug verloren geht. Bei selektiven Verlusten einzelner Zellgruppen, z.B. in Folge zellspezifisch unterschiedlicher Dichtegradienten bei der Zentrifugation, stellt der Zentrifugations- und Waschprozess auch für die 2PF-Methode eine nicht zu vernachlässigende Fehlerquelle dar.

Allerdings werden die Populationen ohne einen Waschprozess nicht so klar abgegrenzt dargestellt und die Unterscheidung zwischen Zellen und dem Debris ist je nach Lyseprotokoll erschwert. Außerdem dürfte bei längerem Einwirken der Lyse der Einfluss auf die Morphologie der Leukozyten ausgeprägter sein, so dass eine Messung im Rahmen der vom Hersteller vorgegebenen Zeiten unbedingt eingehalten werden muss. Ein eventueller Antikörperüberschuss in der Lösung kann höhere Hintergrundsignale hervorrufen. Praktisch haben sich in dieser Untersuchung die Proben jedoch gut auswerten lassen. Nach dem BD-L-Protokoll zeigten immunmarkierte Vollblutproben allerdings manchmal eine unvollständige Erythrozytenlyse.

Eine erste Validierung der volumetrischen Zellzählung erfolgte über den Vergleich der über den Nachweis von  $CD45^+$  Zellen gemessenen Leukozytenzahlen mit denen des Hämatologiezählgerätes (Referenzmethode). Dieses Gerät diente auch als auch als Bezugsgröße für die CD34-Bestimmung (2PF-Methode).

Die Untersuchungen haben ergeben, dass die Leukozytenzahlen nach einer Kernfärbung bei der volumetrischen Durchflusszytometrie vergleichbar sind mit den Zahlen des Hämatologiezählgerätes. Da die Systeme auf vollkommen unterschiedlichen physikalischen Prinzipien basieren, kann die volumengesteuerte durchflusszytometrische Messung somit als korrekt angesehen werden. Bei der Kernfärbung wurde von der Zahl der Zellkerne auf

die Leukozytenzahl geschlossen, bei der HC-Messung werden die Leukozyten mittels einer Widerstandsmessung der Zellen quantifiziert. Bei beiden Methoden sind als Fehlermöglichkeit hohe Zahlen von Erythroblasten oder kernhaltigen, nicht leukozytären Zellen möglich. Hohe Raten dieser Zellen sind der Literatur nach bei bestimmten konsumierenden Erkrankungen und in der Postnatalperiode zu finden.<sup>49</sup> Dass dies zu Fehlern in der Bestimmung CD34<sup>+</sup> Zellen führen kann, ist bekannt und wurde z.B. auch im ISHAGE-Protokoll erwähnt. Mit der herkömmlichen 2PF-Methode wird dieser Fehler vernachlässigt, weil die CD45-Immunmarkierung diese kernhaltigen Zellen nicht erfasst. Eine Kernfärbung parallel zur Immunologischen Bestimmung von Zellen könnte diesen Fehler kontrollieren.

Das konventionelle aber auch das volumengesteuerte Durchflusszytometer wurden für den Standard der 2PF-Methode eingesetzt, um die Geräte mit gleichen Messverfahren vergleichen zu können. Trotz der unterschiedlichen Konstruktionen und der unterschiedlichen Registrations- und Auswertungssoftware zeigten die beiden Durchflusszytometer für die Bestimmung der CD34<sup>+</sup> Zellen in den untersuchten Proben (Vollblut, Leukaphereseprodukte, CD34-aufgereinigte Produkte) gleichartige Ergebnisse. Die relativen Werte für CD34<sup>+</sup> Zellen zu CD45<sup>+</sup> Zellen (Prozentwerte) zeigten eine sehr gute Übereinstimmung zwischen S-DFZ und V-DFZ ( $r \geq 0,99$ ).

Die volumetrische Durchflusszytometrie zeigte im Vergleich mit den Standards (2PF-Durchflusszytometrie, HC) bedeutsame Leukozytenabfälle zwischen 28% und 47%. Generell sind Differenzen bei allen Lysen und allen verwendeten Proben innerhalb der durchgeführten Messreihen nachweisbar.

Daraus ergibt sich die Frage, wie dieser Zellverlust zu interpretieren ist, da das Gerät bei volumetrischer Kernfärbung zuverlässige Werte zeigte.

In früheren Arbeiten sind bereits signifikante Einflüsse von Lysen und Fixantien auf die CD34<sup>+</sup> Anteile an den Leukozyten beschrieben worden.<sup>43 44 45 46 47 48</sup>

Naheliegend ist also, die Verluste auf eine Veränderung oder Zerstörung von Zellen zurückzuführen, die erst in einer volumetrischen Messung offensichtlich



wird. Allerdings sind nach den Lysen – wie im Ergebnisteil beschrieben – nicht signifikant weniger Kerne zählbar. Beim Vergleich dieser Werte mit den Ergebnissen des Hämatologiezählgerätes (als 100% gesetzt) ergeben sich nach den vier Lysen noch zählbare Kerne zwischen 86% und 96% (Präparationen aus Vollblutproben, Leukapherisaten).

In Abb. 20 ist parallel zum Versuchsablauf dargestellt, wie man sich diese Veränderungen sinnvoll erklären kann. Zunächst wird in der Zellsuspension die Zahl der fluoreszenzgefärbten Kerne (Anregung mit der Hb-Lampe) ermittelt. Es werden alle Kerne (hier z.B. acht) der in der Probe enthaltenen Zellen detektiert. In einem Parallelansatz werden immunfluoreszenz-markierte Zellen lysiert und durchflusszytometrisch am selben Gerät untersucht (Laseranregung). Nach der Präparation sind nicht mehr alle Zellen mittels Immunmarkierung nachzuweisen (hier nur fünf von acht). Nach einer Kernfärbung dieser Proben sind allerdings wieder alle Kerne detektierbar.

Daraus lässt sich folgende Hypothese ableiten:

die Erythrozytenlyse wirkt nicht – wie gewünscht – nur auf die Erythrozyten, sondern auch bei besonders empfindlichen Leukozyten auf die Zellmembran ein. Bei der durchflusszytometrischen Messung zeigen die Leukozyten deshalb nicht mehr das charakteristische Bild einer intakten Zelle, sondern sie sind sowohl im FSC-Scatter als auch in den Fluoreszenzkanälen nicht mehr als immunmarkierte Zelle identifizierbar. Die Zelle hat mit ihrer Membran offensichtlich auch die auf ihrer Oberfläche haftenden Antigen-Antikörper-Komplexe verloren und kann deshalb nicht über ein CD-Antigen erkannt werden.

Diese in ihrer äußeren Form zerstörten Zellen besitzen aber noch einen Kern bzw. setzen diesen frei. Diese Kerne unterscheiden sich vermutlich nicht von denen intakter Zellen, deshalb sind auch sie in der Kernfärbung nachweisbar.

Von einer unterschiedlichen Empfindlichkeit verschiedener Leukozyten-subpopulationen muß nach den bisherigen Ergebnissen ausgegangen werden.

Diese zeigt sich bei Versuchen mit identischen Proben, bei denen  $CD45^+$  und  $CD34^+$  Zellverluste verglichen wurden. (s. Abb. 19). Durch die unterschiedliche Empfindlichkeit von Subpopulationen würde auch der Standard der 2PF-Messung in Frage gestellt, weil dabei sowohl nach der Lyse als auch nach der Zellwaschung von einer stets gleich erhaltenen Probenzusammensetzung ausgegangen wird.

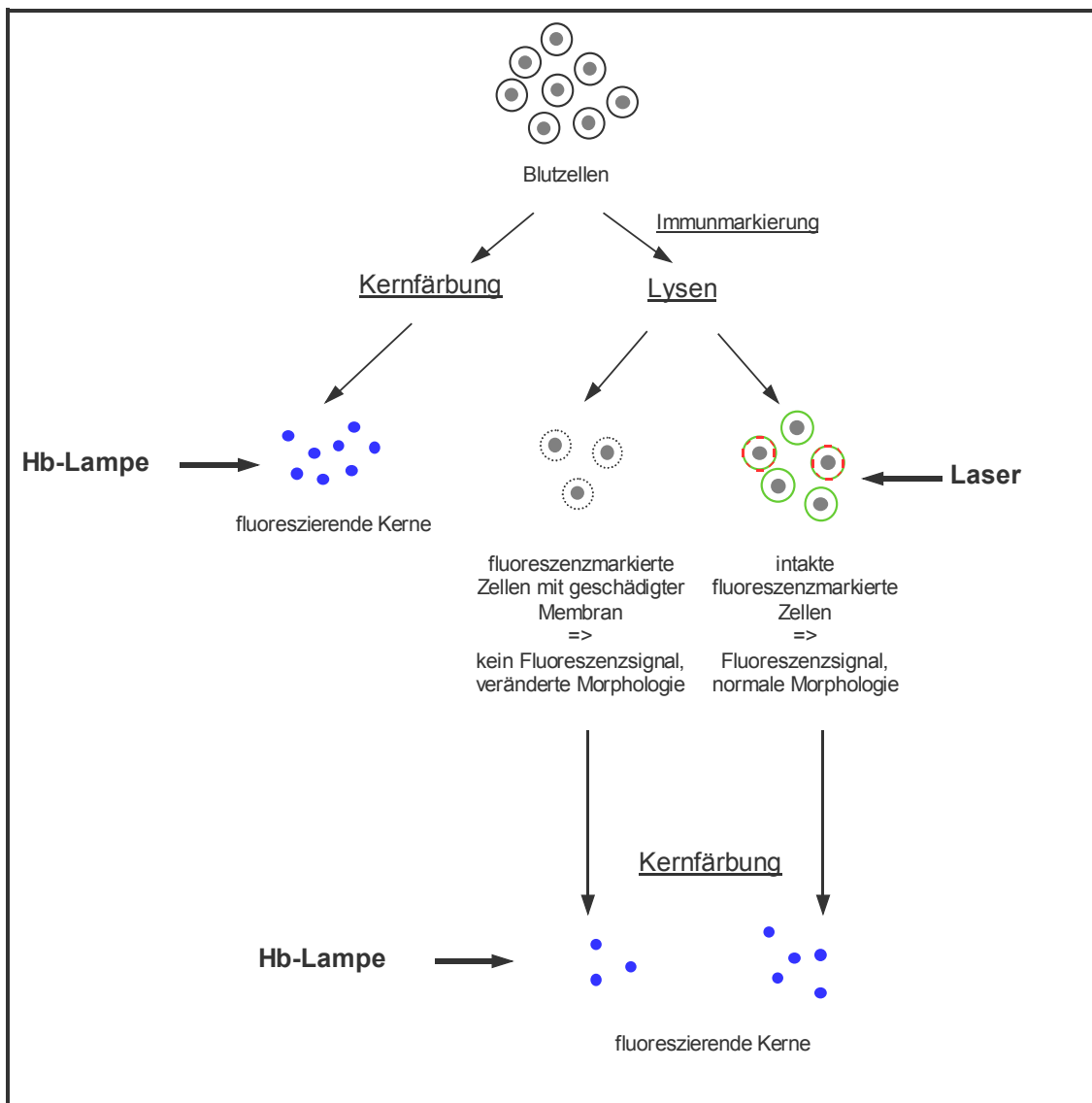


Abbildung 20: Hypothese zur Morphologie der Zellpartikel nach Präparation.

Bei solch signifikanten Einflüssen der Erythrozytenlysen auf die Zellintegrität stellen durchflusszytometrische Methoden mit dieser Präparation – wie die weithin als Standardmethode eingesetzte 2PF-Methode – ein kritisches Verfahren zur akkuraten Bestimmung immunmarkierter Zellen dar.

Ein wichtiger Schritt zur Fehlerkontrolle wäre die Zählung dieser Zellen, ohne auf eine Erythrozytenlyse und möglichst auch andere Manipulationen der Probe angewiesen zu sein. Li et al. entwickelten eine Methode, Vollblutproben ohne Lyse zu analysieren, indem sie als Triggerparameter für die Zellerfassung das Fluoreszenzsignal nutzten.<sup>80</sup> Übertragen auf die Stammzellzählung könnte der Trigger das Fluoreszenzsignal der CD45-exprimierenden Leukozyten sein. Mit einer Triggerung über das CD34-Signal erhielte man eine Darstellung, in der allein die CD34<sup>+</sup> Zellen sichtbar sind. Die zur Immunmarkierung parallel durchgeführte Kernfärbung ist beschrieben,<sup>81</sup> macht aber einen kostenintensiven UV-Laser nötig und scheint daher weniger für die Routine geeignet. Andere Ansätze, wie die von Fornas et al. und Alvarez-Larran et al. durchgeführten, nutzen die Kombination von DNA-/ RNA-Färbung und Immunmarkierung.<sup>82 83</sup> Bei diesen Methoden kann – falls keine Waschschriffe erfolgen – der Bezug zum Ursprungsvolumen der Probe erhalten bleiben, so dass sie für volumetrische Messungen geeignet sind.

Eine Beurteilung der Vitalität der Zellen parallel zur Immunfärbung könnte zeigen, welche der gemessenen Zellen besonders empfindlich auf Präparationen reagieren.

Eine weitere mögliche Erklärung für die erniedrigten Zellzahlen in der volumetrischen Messung ist, dass in der vom Patienten abgenommenen Probe sofort oder schon durch kurze Lagerung morphologische Veränderungen auftreten,<sup>84</sup> die durch eine Leukozytenzählung mittels Hämatologiezählgerät bzw. durch Kernfärbung nicht detektiert werden.

In der Zusammenschau der Ergebnisse entsteht die Frage, ob diese Arten der Leukozytenquantifizierung – trotz teils jahrelanger Anwendung – überhaupt wahre Aussagen über die Zahl und Qualität leukozytärer Zellen liefern können. Die durchflusszytometrischen Methoden erlauben zwar, große Zellzahlen in

kurzer Zeit analysieren zu können, allerdings auf Kosten einer direkten optischen Kontrolle der suspendierten Zellen.

Eine weitere Fehlerquelle – gerade auch im Hinblick auf die verschiedenen Lysetechniken – ist der Auswertemodus der dot-plots. Mit dieser Thematik setzten sich schon viele Veröffentlichungen auseinander, weil in den von Labor zu Labor unterschiedlichen Auswertemodi ein wesentlicher Faktor für differierende CD34-Messungen entdeckt werden konnte. Durch Auswertestrategien – wie z.B. in den ISHAGE- und DGTI/ DGHO-Protokollen beschrieben – lassen sich diese Fehlermöglichkeiten bei einheitlicher Präparation gut kontrollieren.

Die Anwendung verschiedener Protokolle beschränkt jedoch die Vergleichbarkeit zwischen den Laboren. So ist die Auswertung bei verschiedenen Lysen unterschiedlich komfortabel, weil die Abgrenzung und Lage der Zielpopulationen stark differieren kann (Abb. 7). Deshalb können durch die Definition der Regionen bedingte Unterschiede auch bei standardisiertem Vorgehen nicht immer ausgeschlossen werden. In dieser Untersuchung sind die prozentualen Unterschiede der CD34-Zellzahlen zwischen den Lyseverfahren allerdings nicht signifikant. Ein sicherer Vorteil durch die Verwendung einer bestimmten z.B. fixanzienfreien Erythrozytenlyse liegt somit nicht vor.

Im Hinblick auf den Verbrauch an Antikörpern bzw. Reagenzien unterscheiden sich die beiden Durchflusszytometer nicht, weil die Probenvorbereitung gleich abläuft. Ein wesentlicher Vorteil der 1PF-Bestimmung jedoch ist, auf die Messung am Hämatologie-Zellzählgerät verzichten zu können und so auch die Messfehler des Zweitgerätes auszuschließen. Allerdings ist kein wesentlicher personeller und apparativer Mehraufwand mit der Messung am Hämatologiezählgerät verbunden, weil dieses zur Grundausstattung im hämatologischen Labor gehört und bei schwerkranken hämatologisch-onkologischen Patienten eine regelmäßige Blutbildanalyse ohnehin geboten ist. Ein weiterer Vorteil des volumetrischen Zytometers ist sicherlich, schnell ein großes Probenvolumen untersuchen zu können. So wird eine statistisch

befriedigende Analyse der Subklassen und niedriger CD34-Zahlen erleichtert.<sup>39</sup> Gerade die Charakterisierung und Quantifizierung seltener Ereignisse, wie z.B. KDR<sup>+</sup> oder CD133<sup>+</sup> Zellen als frühe hämatogene Progenitorzellen, ließe sich mit dem volumetrischen Verfahren gut durchführen, da die standardmäßig vorhandene Volumeneinheit von 200µl auf bis zu 1000µl Zählvolumen eingestellt werden kann. Somit kann das analysierte Nettovolumen verfünffacht werden. Die Varianz des abgemessenen Volumens beträgt dabei laut Herstellerangaben nur  $\pm 2\%$ . Ein signifikanter systematischer Fehler im Bereich der Volumenabmessung am Gerät kann somit weitestgehend ausgeschlossen werden. Die Pipettenwartung und der Pipettiervorgang wurden besonders sorgfältig durchgeführt, um Volumenfehler in der manuellen Probenaufbereitung zu vermeiden. Ferner lassen sich beim volumetrischen Durchflusszytometer die dot-plot Analysen mit der dazugehörigen auf Windows basierenden Software gut auswerten.

Für die 2PF-Messung spricht die große Erfahrung mit dieser Methode. Auf dieser basieren viele klinisch-empirisch gewonnene Grenzwerte, z.B. zum Transplantationserfolg. Bisherige neue Techniken hatten sich dieser Referenzmethode zu stellen.

Bei vielen Untersuchungen zum Vergleich zwischen 2PF- und 1PF-Methoden wurde schwerpunktmäßig der Korrelationskoeffizient für die Beurteilung der Methoden angegeben. Er allein sagt aber wenig über die Richtigkeit von Methoden aus. Die Verzerrung zwischen zwei Methoden kann trotz exzellenter Korrelationen sehr groß sein.

Demzufolge ist in der Stammzellzählung durch die Standardisierung der Methoden mittels umfangreicher Protokolle zwar eine intra- und inter-Laborpräzision erreicht worden, aber die Richtigkeit der bisher angewandten und empfohlenen 2PF-Methode muss aufgrund dieser Untersuchungen zumindest in Frage gestellt werden.

Mit der Entdeckung neuer früher Stammzellmarker wird der Eingang dieser Marker in die Routinediagnostik denkbar. Um Zellen als besonders früh in der hämatopoetischen Reihe einzuordnen, sind auch andere Co-

Expressionsmarkern z.B. CD38-, CD90-, HLA-DR- und CD133 oder KDR geeignet. Die Subklassen stellen allerdings teilweise nur einen geringen Prozentsatz an den CD34<sup>+</sup> Zellen und somit einen noch geringeren Anteil an den Leukozyten. Auch für Subklassenanalysen ist somit umso mehr eine hohe Richtigkeit der Bestimmungen zu fordern.

Derzeit können diese Marker kaum standardisiert und zuverlässig in der Routinekontrolle quantifiziert werden, wenn noch nicht einmal bei den CD34<sup>+</sup> Zellzahlen ein befriedigender weltweiter Standard durchgesetzt werden konnte. Ein Problem, welches bei allen Laboruntersuchungen an biologischen Proben nicht vernachlässigt werden darf, ist die individuelle Empfindlichkeit unterschiedlicher Zellpopulationen auf prä-analytische Arbeitsschritte. So werden Leukozyten sowohl innerhalb gesunder Probandengruppen als auch bei hämatologisch erkrankten Personen verschieden auf äußere Einflüsse reagieren. Allein deshalb werden sich die Lyseverluste nicht als ein exakter Prozentsatz der Leukozyten festlegen lassen, um so Umrechnungsfaktoren zwischen 2PF-Messungen und 1PF-Messungen zu finden.

Das Ziel, zuverlässige Zellzählungen von Leukozyten und Stammzellen durchzuführen, um die Transplantatqualität zu objektivieren ist noch nicht erreicht. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Lyseverluste sind zumindest in den internen und externen Ringversuchen – in denen regelhaft nur eine Auswertung mit nicht-volumengesteuerten DFZs durchgeführt wird – nicht nachweisbar bzw. nicht quantifizierbar. Aufgrund der hier beschriebenen Probleme bei der Erythrozytenlyse muss nach alternativen Methoden zur sicheren und ökonomischen Quantifizierung von Leukozytensubpopulationen gesucht werden. Bis diese weltweit standardisiert und in der Klinik etabliert sind, sollte sich der Anwender aber zumindest der Fehler bei Anwendung bisheriger Methoden und Präparationen bewusst sein.

Die Arbeit soll als Anregung für künftige Studien zur Entwicklung neuer durchflusszytometrischer Techniken dienen. Diese könnten sich auf lysefreie Präparationen stützen. Alternativ könnten die Leukozyten Antikörper- bzw. Farbstoff- getriggert vom Debris abgegrenzt werden.

Weiterhin könnten im Hinblick auf die zukünftige Bedeutung neuer Stammzellmarker die selektiven Einflüsse von Lysen auch auf diese Leukozytensubpopulationen untersucht werden.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

|              |  |
|--------------|--|
| 1PF          | Ein-Plattform Technik  |
| 2PF          | Zwei-Plattform Technik   |
| ALL          | Akute lymphatische Leukämie  |
| BD-L         | Präparation mit Becton Dickinson Lysing Solution   |
| CD34/P       | CD34 aufgereinigte Proben  |
| CLL          | Chronisch lymphatische Leukämie  |
| CY-L         | CyLyse Präparation   |
| DA-L         | Präparation mit Dako Uti-Lyse  |
| DFZ          | Durchflusszytometer  |
| DGHO         | Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie  |
| DGTI         | Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie   |
| FITC         | Fluoreszeinisothiocyanat, Fluoreszenzfarbstoff   |
| FI-I         | Fluoreszenz 1  |
| FI-II        | Fluoreszenz 2  |
| FSC          | engl: forward angle scatter  |
| G1-Phase     | postmitotische Ruhephase des Zellzyklus  |
| G2 –Phase    | prämitotische Ruhephase des Zellzyklus   |
| G-CSF        | engl: Granulocyte Colony stimulating factor  |
| GM-CFUs      | engl: Granulocyte-Monocyte-Colony Forming Units  |
| GvH-Reaktion | engl: Graft-versus-Host-Reaktion   |
| Hb-Lampe     | Quecksilberlampe   |
| HC           | Hämatologie-Zählgerät  |
| HLA          | engl: human leucocyte antigene   |
| HPC-Zellen   | hämatopoetischen Progenitor-Zellen   |
| HSC          | hämatopoetische Stammzellen  |
| ISHAGE       | International Society of Hematotherapy and Graft Engineering, jetzt: International Society for Cellular Therapy (ISCT) |



– Abkürzungsverzeichnis –

|         |  |
|---------|--|
| KDR     | Kinase insert domain receptor, siehe auch: VEGFR-2                   |
| K-EDTA  | Kalium-Ethylendiamintetraessigsäure                                  |
| KF      | Kernfärbung  |
| KMT     | Knochenmarktransplantation   |
| LP      | Leukapherese Proben  |
| NRBC    | engl: nucleated red blood cells                                      |
| OD-L    | Präparation mit Ortho-mune Lyse                                      |
| OD-LW   | Präparation mit Ortho-mune Lyse und Waschen der Zellen               |
| PBS     | engl: phosphate buffered saline                                      |
| PBSCT   | periphere Blutstammzelltransplantation                               |
| PE      | Phycoerythrin, Fluoreszenzfarbstoff                                  |
| S-Phase | DNA Synthesephase des Zellzyklus                                     |
| S-DFZ   | Signalgesteuertes Durchflusszytometer                                |
| SSC     | engl: side scatter   |
| VB      | Vollblut   |
| V-DFZ   | volumengesteuertes Durchflusszytometer                               |
| VEGFR-2 | engl: vascular endothelial growth factor Receptor-2, siehe auch: KDR |

## 7 Abbildungsverzeichnis

|               |  |    |
|---------------|--|----|
| Abbildung 1:  | FSC/SSC-Diagramm einer Vollblutprobe.  | 18 |
| Abbildung 2:  | Schema Fluoreszenzmarkierung von Zellen und ihre Erfassung im Durchflusszytometer.   | 19 |
| Abbildung 3:  | Prinzip des volumetrischen Durchflusszytometers (V-DFZ).   | 21 |
| Abbildung 4:  | Versuchsablauf.  | 22 |
| Abbildung 5:  | DNA-Messung am volumetrischen Zytometer (Kernfärbung).   | 24 |
| Abbildung 6:  | Gating Strategie.  | 26 |
| Abbildung 7:  | Dot-plot Darstellung einer Vollblutprobe (Patient 6) nach den verschiedenen Präparationen.                                   | 29 |
| Abbildung 8:  | Korrelation der Leukozytenbestimmung zwischen HC und Kernfärbung am V-DFZ.   | 32 |
| Abbildung 9:  | Bland-Altman Analyse der Leukozytenzahlen. Ergebnisse der Kernfärbung am V-DFZ im Vergleich zur Referenzmethode (HC).        | 33 |
| Abbildung 10: | Korrelationen der CD34 <sup>+</sup> -Bestimmung zwischen S-DFZ und V-DFZ (Auswertung nach der 2PF-Methode).                  | 35 |
| Abbildung 11: | Bland-Altman Analyse der CD34 <sup>+</sup> -Zahlen. Vergleich des Zwei-Plattform Modus des V-DFZ mit der Referenz des S-DFZ. | 36 |
| Abbildung 12: | Leukozytenzahl ( CD45 <sup>+</sup> Zellen) im Vollblut.  | 38 |
| Abbildung 13: | Leukozyten/ CD45 <sup>+</sup> Zellen in Leukaphereseprodukten.   | 40 |

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 14: CD34 <sup>+</sup> in Vollblutproben.                                   | 41 |
| Abbildung 15: CD34 <sup>+</sup> Zellen in Leukaphereseprodukten.                     | 42 |
| Abbildung 16: CD34 <sup>+</sup> Zellen in hochreinen CD34-selektionierten Produkten. | 43 |
| Abbildung 17: Kernfärbung von Leukozyten (Vollblut).                                 | 45 |
| Abbildung 18: Kernfärbung von Leukozyten (Leukaphereseprodukte).                     | 46 |
| Abbildung 19: Selektive Einflüsse der OD-L Präparation.                              | 47 |
| Abbildung 20: Hypothese zur Morphologie der Zellpartikel nach Präparation.           | 52 |

## 8 Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1: Patientenkollektiv.  | 15 |
| Tabelle 2: Leukozyten und CD34-Zahlen (Patient 6).  | 30 |
| Tabelle 3: Anteil der CD34 <sup>+</sup> Zellen an den CD45 <sup>+</sup> Leukozyten in % und die Korrelation (r) im Vergleich mit der Standardmethode. | 44 |

## 9 Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> Powles R, Mehta J, Kulkarni S, Trelaven J, Millar B, Marsden J, Shepherd V, Rowland A, Sirohi B, Tait D, Horton C, Long S, Singhal S. Allogenic blood and bone-marrow stem-cell transplantation in haematological malignant diseases: a randomised trial. *Lancet* (2000) 355:1231-1237
- <sup>2</sup> Buckner CD. Autologous bone marrow transplants to hematopoietic stem cell support with peripheral blood stem cells: a historical perspective. *J Hematother* (1999) 8: 233-236
- <sup>3</sup> Elias A. Hematopoietic stem cell transplantation for small cell lung cancer. *Chest* (1999)116:531-538
- <sup>4</sup> Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, Casassus P, Maisonneuve H, Facon T, Ifrah N, Payen C, Bataille R. A prospective randomised trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med* (1996) 335:91-7.
- <sup>5</sup> Laurence AD, Goldstone AH. High-dose therapy with haematopoietic transplantation for Hodgkin's lymphoma. *Semin Haematol* (1999) 36: 303-12.
- <sup>6</sup> Snowden JA, Brooks PM, Biggs JC. Haemopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. *Br J Haematol* (1997) 99:9-22.
- <sup>7</sup> Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, Varadi G, Kirschbaum M, Ackerstein A, Samuel S, Amar A, Brautbar C, Ben-Tal O, Eldor A, Or R. Non-myeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and non-malignant hematologic diseases. *Blood* (1998) 91:756-63.

- <sup>8</sup> Lennard AL, Jackson GH. Stem cell transplantation. *BMJ* (2000) 321(7258): 433-7
- <sup>9</sup> Gianni AM, Bregni M, Siena S. Rapid and complete hemopoietic reconstitution following combined transplantation autologous blood and bone marrow cells. A changing role for high-dose chemotherapy? *Hematol Oncol* (1989) 7: 139
- <sup>10</sup> Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, Clift R, Forman SJ, Negrin R, Kashyap A, Flowers ME, Lilleby K, Chauncey TR, Storb R, Appelbaum FR. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med* (2001) Jan 18;344(3):175-81
- <sup>11</sup> Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: Structure, biology, and clinical utility. *Blood* (1996) 87 (1):1-13
- <sup>12</sup> Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, Kögler G, Wernet P. Intrakoronare, humane autologe Stammzelltransplantation zur Myokardregeneration nach Herzinfarkt. *Dtsch. med. Wschr.* (2001) 126: 932-938
- <sup>13</sup> Comi G, Kappos L, Clanet M, Ebers G, Fassas A, Fazekas F, Filippi M, Hartung HP, Hertenstein B, Karussis D, Martino G, Tyndall A, van der Meche FGA. Guidelines for autologous blood and marrow stem cell transplantation in multiple sclerosis. *J Neurol* (2000) 247:376-382

- <sup>14</sup> Przepiorka D, Smith TL, Folloder J, Khouri I, Ueno NT, Mehra R, Körbling M, Huh YO, Giralt S, Gajewski J, Donato M, Cleary K, Claxton D, Braunschweig I, van Besien K, Anderson BS, Anderlini P, Champlin R. Risk factors for acute graft-versus-host disease after allogenic blood stem cell transplantation. *Blood* (1999) 94(4): 1465-1470
- <sup>15</sup> Cutler C, Antin JH. Peripheral blood stem cells for allogenic transplantation: a review. *Stem Cells* (2001) 19:108-117
- <sup>16</sup> Socie G, Loiseau P, Tamouza R, Janin A, Busson M, Gluckman E, Charron D. Both genetic and clinical factors predict the development of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation* (2001) 72 (4): 699-706
- <sup>17</sup> Gluckmann E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematology* (2000) 28:1197-1205
- <sup>18</sup> Fraipont V, Sautois B, Baudoux E, Pereira M, Fassotte MF, Hermanne JP, Jerusalem G, Longree L, Schaaf-Lafontaine N, Fillet G, Beguin Y. Successful mobilization of peripheral blood HPCs with G-CSF alone in patients failing to achieve sufficient numbers of CD34+ cells and /or CFU-GM with chemotherapy and G-CSF. *Transfusion* (2000) 40:339-347
- <sup>19</sup> Haas R. Hochdosistherapie und Blutstammzelltransplantation bei malignen Erkrankungen: Empfehlungen zur Qualitätssicherung. *J Lab Med* (1996) 20(6):327-332
- <sup>20</sup> Schwartzberg LS, Birch R, Hazelton B, Tauer KW, Lee P Jr, Altemose R, George C, Blanco R, Wittlin F, Cohen J, et al. Peripheral blood stem cell mobilization by chemotherapy with and without recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *J Hematother* (1992) 1(4):317-27

- <sup>21</sup> Fontao-Wendel R, Lazar A, Melges S, Altobelli C, Wendel S. The absolute number of circulating CD34+ Cells as the best predictor of peripheral hematopoietic stem cell yield. *J Hematother* (1999) 8:255-262
- <sup>22</sup> Gutensohn K, Serke S. Durchflusszytometrische Analyse CD34-exprimierender hämatopoetischer Zellen in Blut und Zytaphereseprodukten. *Infusionsther Transfusionsmed* (1996) 23 (suppl 2): 1-23
- <sup>23</sup> Richtlinien zur Transplantation peripherer Blutstammzellen. Erarbeitet vom Wissenschaftlichen Beirat der Bundesärztekammer unter Mitwirkung des Paul-Ehrlich-Institutes. *Dt Ärztebl* (1997) 94 (23): 1268-1276.
- <sup>24</sup> Empfehlungen zur Blutstammzellapherese der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI). *Infusionsther Transfusionsmed* (1998) 25:325-335
- <sup>25</sup> Cassens U, Ostkamp-Ostermann P, van der Werf N, Garritsen H, Ostermann H, Sibrowski W. Volume-dependent collection of peripheral blood progenitor cells during large-volume leukapheresis for patients with solid tumors and haematological malignancies. *Transfusion Medicine* (1999) 9:311-320
- <sup>26</sup> Krüger W, Stockschröder M, Hassan HT, Zander AR. Purging in der Knochenmark- und Stammzelltransplantation. *J Lab Med* (1996) 20(4):210-220
- <sup>27</sup> Law P, Traylor L, Recktenwald DJ. Cell analysis for hematopoietic stem/progenitor cell transplantation. *Cytometry* (1999) 38: 47-52

- <sup>28</sup> Fritsch G, Emminger W, Buchinger P, Printz D, Gadner H. CD34-positive cell proportions in peripheral blood correlate with colony-forming capacity. *Exp Hematol* (1991) 19:1079-1083
- <sup>29</sup> Rock G, Chin-Yee I, Cantin G, Giulivi A, Gluck S, Keating A, Keeny M, Klassen J, Sutherland R. Quality assurance of progenitor cell content of apheresis products: a comparison of clonogenic assays and CD34+ enumeration. *Transfusion Medicine* (2000) 10:67-75
- <sup>30</sup> Sharp JG, Kessinger A, Lynch JC, Pavletic ZS, Joshi SS. Blood stem cell transplantation: factors influencing cellular immunological reconstitution. *J Hematother Stem Cell Res* (2000) 9:971-981
- <sup>31</sup> Waples JM, Moreb JS, Sugrue M, Belanger G, Kubilis P, Lynch JW, Gian V, Weeks F, Wingard J. Comparison of autologous peripheral blood stem cell dosing by ideal vs actual body weight. *Bone-Marrow-Transpl* (1999) 23:867-873
- <sup>32</sup> Melamed MR. A brief history of flow cytometry and sorting. *Meth Cell Biol* (2001) 63: 3-17
- <sup>33</sup> Dietz LJ, Dubrow RS, Manian BS, Sizto NL. Volumetric capillary cytometry: a new method for absolute cell enumeration. *Cytometry* (1996) 23:177-186
- <sup>34</sup> Pollard Y, Watts MJ, Grant D, Chavda N, Linch DC, Machin SJ. Use of the haemopoietic progenitor cell count of the Sysmex SE-9500 to refine apheresis timing of peripheral blood stem cells. *Br J Haematol* (1999) 106(2):538-44



- <sup>35</sup> Siena S, Bregni M, Brando B, Bonadonna G, Gianni AM. Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: Enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* (1989) 74:1905-1914
- <sup>36</sup> Siena S, Bregni M, Di Nicola M, Peccatori F, Magni M, Brando B, Ravagnani F, Gianni AM. Milan protocol for clinical CD34+ cell estimation in peripheral blood for autografting in patients with cancer. In: *Hematopoietic Stem cells: The Mulhouse Manual*. Wunder E, Sovalat H, Henon PR, Serke S (Hrsg.). AlphaMed Press, Dayton, OH (1994) 23-30
- <sup>37</sup> Bender, J.G., Unverzagt, K., Walker, D. (1994) Guidelines for determination of CD34+ cells by flow cytometry: Application to the harvesting and transplantation of peripheral blood stem cells. In: *Hematopoietic Stem Cells* (eds Wunder, E., Sovalat, H., Henon, P., Serke, S.), 31-43. AlphaMed Press, Dayton.
- <sup>38</sup> Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *J Hematother* (1996) 5: 213-226
- <sup>39</sup> Dzik S. Principles of counting low numbers of leukocytes in leukoreduced blood components. *Transfusion Med* (1997) 11 (1): 44-55
- <sup>40</sup> Kreissig, C., Kirsch, A., Serke, S. Characterization and measurement of CD34-expressing hematopoietic cells. *Journal of Hematotherapy* (1994), 3 (4), 263-289.

- <sup>41</sup> Tatsumi N, Tsuda I, Furota A, Takubo T, Hayashi M, Matsamoto H. Principle of blood cell counter-development of electric impedance method. *Sysmex J Int* (1999) 9: 8-20
- <sup>42</sup> Cassens U, Greve B, Tapernon K, Nave B, Severin E, Sibrowski W, Göhde W. A simple and accurate flow cytometric method for the determination of low leukocyte concentrations in aplastic patients and in blood components. *Vox Sanguinis* (2002) 82: 198-206
- <sup>43</sup> Serke S, Huhn D. Expression of class I, II, and III epitopes of the CD34 antigen by normal and leukemic hematopoietic cells. *Cytometry* (1996) 26: 154-160
- <sup>44</sup> Bossuyt X, Marti GE, Fleisher, TA. Comparative analysis of whole blood lysis methods for flow cytometry. *Cytometry* (1997) 30:124-133
- <sup>45</sup> Cassens U, Gutensohn K, Garritsen H, Kelsch R, Kuehnel P, Sibrowski W. The influence of different erythrocyte lysing procedures on flow cytometric determination of CD34+ cells in umbilical cord blood transplants. *Transfusion Medicine* (1998) 8:111-118
- <sup>46</sup> Serke S, van Lessen A, Pardo I, Huhn D. Selective susceptibility of CD34-expressing cells to acquire flow cytometric features of apoptosis/ necrosis upon exposure to an ammonium chloride-based red blood cell lysing agent. [Letter to the editor] *J Hematother* (1998) 7:315-318
- <sup>47</sup> Keeney M, Chin-Yee I, Nayar R, Sutherland DR. Effect of fixatives on CD34+ cell enumeration. *J Hematother Stem Cell Res* (1999) 8:327-329

- <sup>48</sup> Gratama JW, Menendez P, Kraan J, Orfao A. Loss of CD34+ hematopoietic progenitor cells due to washing can be reduced by the use of fixative-free erythrocyte lysing reagents. *J. Immunol Methods* (2000) 239:13-23
- <sup>49</sup> Tsuji T, Sakata T, Hamaguchi Y, Wang F, Houwen B. New rapid flow cytometric method for the enumeration of nucleated red blood cells. *Cytometry* (1999) 37: 291-301
- <sup>50</sup> Menendez P, Redondo O, Rodriguez A, Lopez-Berges MC, Ercilla G, Lopez A, Duran A, Almeida J, Perez-Simon JA, San Miguel JF, Gratama JW, Orfao A. Comparison of a lyse-and-then-wash method and a lyse-non-wash technique for the enumeration of CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Cytometry* (1998) 34: 264-271
- <sup>51</sup> Brando B, Barnett D, Janossy G, Mandy F, Autran B, Rothe G, Scarpati B, D'Avanzo G, D'Hautcourt JL, Lenkei R, Schmitz G, Kunkl A, Chianese R, Papa S, Gratama JW. Cytofluorometric methods for assessing absolute numbers of cell subsets in blood. *Cytometry* (2000) 42:327-346
- <sup>52</sup> Brando B, Göhde W Jr, Scarpati B, D'Avanzo G. The „vanishing counting bead“ phenomenon effect on absolute CD34+ cell counting in phosphate-buffered saline-diluted leukapheresis samples. *Cytometry* (2001) 43:154-160
- <sup>53</sup> Gratama JW, Kraan J, Levering W, Van Bockstaele DR, Rijkers GT, Van der Schoot CE. Analysis of variation in results of CD34+ hematopoietic progenitor cell enumeration in a multicenter study. *Cytometry* (1997) 30:109-117
- <sup>54</sup> Chin-Yee I, Anderson L, Keeney M, Sutherland DR. Quality assurance of stem cell enumeration by flow cytometry. *Cytometry* (1997) 30:296-303

- <sup>55</sup> Dzik W, Sniecinski I, Fischer J. Toward standardization of CD34+ cell enumeration: an international study. *Transfusion* (1999) 39:856-863
- <sup>56</sup> Barnett D, Granger V, Whitby L, Storie I, Reilly JT . Absolute CD4+ T-lymphocyte and CD34+ stem cell counts by single-platform flow cytometry: the way forward. *Br J of Haematol* (1999) 106:1059-1062
- <sup>57</sup> Barnett D, Granger V, Kraan J, Whitby L, Reilly JT, Papa S, Gratama JW. Reduction of intra- and interlaboratory variation in CD34+ stem cell enumeration using stable test material, standard protocols and targeted training. *Br J of Haematol* (2000)108: 784-792
- <sup>58</sup> Yenerel MN, Budack-Alpdogan T, Kalayoglu-Besisik S, Yanasik M, Sargin D. The influence of flow cytometric gating strategy and cell preparation procedures on CD34+ cell quantification. *J Hematother Stem Cell Res* (2000) 9:11-12
- <sup>59</sup> Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *Cytometry* (1998) 34: 61-70
- <sup>60</sup> Gratama JW, Braakman E, Kraan J, Lankheet P, Levering WHBM, Van den Beemd MWM, Van der Schoot CE, Wijermans P, Preijers F. Comparison of single and dual-platform assay formats for CD34+ haematopoietic progenitor cell enumeration. *Clin Lab Haem* (1999) 21: 337-346
- <sup>61</sup> Gutensohn K, Carrero I, Krueger W, Kroeger N, Schäfer P, Luedemann K, Kuehnl P. Semi-automated flow cytometric analysis of CD34-expressing hematopoietic cells in peripheral blood progenitor cell apheresis products. *Transfusion* (1999) 39:1220-12226

- <sup>62</sup> Barbosa IL, Sousa ME, Godinho MI, Sousa F, Carvalhais A. Single- versus dual-platform assays for human CD34+ cell enumeration. *Cytometry* (1999) 38:274-279
- <sup>63</sup> Sims LC, Brecher ME, Gertis K, Jenkins A, Nickischer D, Schmitz JL, Sparks S, Wright P, Bentley SA. Enumeration of CD34-positive stem cells: evaluation and comparison of three methods. *J Hematother* (1997) 6: 213-226
- <sup>64</sup> Bender JG, Unverzagt KL, Walker DE, Lee W, Van Epps DE, Smith DH, Stewart CC, To LB. Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. *Blood* (1991) 15;77(12): 2591-2596
- <sup>65</sup> Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. CD133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* (1997) 90(12): 5002-5012
- <sup>66</sup> Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schäfer B, Hossfeld DK, Fiedler W. In vitro differentiation of endothelial cells from CD133-positive progenitor cells. *Blood* (2000) 95 (10): 3106-3112
- <sup>67</sup> Ziegler BL, Valtieri M, Almeida Porada G, De Maria R, Müller R, Masella B, Gabbianelli M, Casella I, Pelosi E, Bock T, Zanjani ED, Peschle C . KDR Receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* (1999) 235: 1553-1558
- <sup>68</sup> Labastie MC, Cortes F, Romeo PH, Dulac C, Peault B. Molecular identity of hematopoietic precursor cells emerging in the human embryo. *Blood* (1998) 92 (10): 3624-3635

- <sup>69</sup> Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MAS, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and CD133 by circulating human CD34<sup>+</sup> cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* (2000) 95 (3): 952-958
- <sup>70</sup> Bühring HJ, Seiffert M, Bock TA, Scheduling S, Thiel A, Scheffold A, Kanz L, Brugger W. Expression of novel surface antigens on early hematopoietic cells. *Ann N Y Acad Sci* (1999) 872: 25-38
- <sup>71</sup> Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* (1996) 273:242-245
- <sup>72</sup> Huss R, Günther W, Schumm M, Ottinger H, Grosse-Wilde H, Kolb HJ. CD34-negative hematopoietic stem cells isolated from human peripheral blood cell as ultimate precursors of hematopoietic progenitors. *Infusionsmed Transfusionsmed* (1997) 24: 404-409
- <sup>73</sup> Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M . Human bone marrow CD34<sup>-</sup> cell engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34<sup>+</sup> cells. *Exp Hematol* (1998) 26:353-360
- <sup>74</sup> Nakauchi H. Hematopoietic stem cells: are they CD34-positive or CD34-negative? *Nature med* (1998) 4(9): 1009-1010
- <sup>75</sup> Donnelly DS, Zeltermann D, Sharkis S, Krause DS. Functional activity of murine CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>-</sup> hematopoietic stem cell populations. *Exp Hematol* (1999) 27:788-796

- <sup>76</sup> Sakabe H, Ohmizono Y, Tanimukai S, Kimura T, Mori KJ, Abe T, Sonoda Y. Functional differences between subpopulations of mobilized peripheral blood-derived CD34<sup>+</sup> cells expressing different levels of HLA-DR, CD33, CD38 and c-kit Antigens. *Stem Cells* (1997) 15:73-81
- <sup>77</sup> Baech J, Johnsen HE. Technical aspects and clinical impact of hematopoietic progenitor subset quantification. *Stem Cells* (2000) 18: 76-86
- <sup>78</sup> Aus: Schmitz G, Rothe G. Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Schattauer (1994) , Stuttgart New York
- <sup>79</sup> Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* (1986) 1(8476): 307-310
- <sup>80</sup> Li N, Hallden G, Hjemdahl P. A whole-blood flow cytometric assay for leukocyte CD11b expression using fluorescence signal triggering. *Eur J Haematol* (2000) 65:57-65
- <sup>81</sup> Douglas RS, Pletcher CH, Nowell PC, Moore JS. Novel approach for simultaneous evaluation of cell phenotype, apoptosis, and cell cycle using multiparameter flow cytometry. *Cytometry* (1998) 32:57-65
- <sup>82</sup> Fornas O, Garcia J, Petriz J. Flow cytometry counting of CD34<sup>+</sup> cells in whole blood. *Nature Med* (2000) 6(7): 833-836
- <sup>83</sup> Alvarez-Larran A, Jover L, Marin P, Petriz J. A multicolor, no-lyse no-wash assay for the absolute counting of CD34<sup>+</sup> cells by flow cytometry. *Cytometry* (2002) 50(5):249-53
- <sup>84</sup> Manion K, Frey T. Apoptosis of cells in aged samples as detected by the ProCount reagent. *Cytometry* (1996) 26:317-322





## **Danksagung**

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Sibrowski danke ich für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, die Laboratorien der Transfusionsmedizin nutzen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Uwe Cassens, der mich seit Beginn betreut und durch die Höhen und Tiefen meiner Arbeit begleitet hat. Außerdem danke ich für die konstruktive Durchsicht der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Göhde danke ich für die Möglichkeit, an den Geräten im Institut für Strahlenbiologie forschen zu können und für seine Unterstützung, besonders zu Zeiten, als die Ergebnisse der Messungen noch rätselhaft erschienen.

Herrn Dr. Burkhard Greve danke ich für seine Hilfe und die vielen wertvollen Ratschläge, die mir sowohl bei den Experimenten als auch für die schriftliche Umsetzung der Arbeit eine große Hilfe waren.

Mein Dank für die Unterstützung bei meinen Experimenten gilt den Mitarbeitern der Strahlenbiologie Herrn Dr. Erhard Severin, Frau Dr. Elke Pascher, Frau Petra Berkes und besonders Frau Gerlind Bellmann, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Den Mitarbeitern des Stammzelllabors der Transfusionsmedizin, insbesondere Frau Kordula Lippert-Coerdt, Frau Nicole Goetzelmann, Frau Alexandra Mertens und Frau Eva Funk, möchte ich für die Einarbeitung in die Durchflusszytometrie, die Hilfe bei der Probengewinnung und für die vergleichenden Messungen am FACS danken.

Meinen Eltern gilt mein herzlichster Dank, dass sie mich stets auf meinem Lebensweg unterstützt und gefördert haben.