

Interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation des Universitätsklinikums

Hamburg – Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. Axel R. Zander

**Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivität als neuer  
funktionaler Marker  
für die Qualitätsbewertung der hämatopoetischen  
Stammzelltransplantate**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Christa Dellbrügger**

aus Herdecke (Ruhr)

Hamburg 2008

Wissenschaftlicher Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. Axel R. Zander  
Direktor der Interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität  
Hamburg am: 12.01.2010**

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss: der Vorsitzende    Prof. Dr. A.R. Zander

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter        Prof. Dr. R. Erttmann

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter        Prof. Dr. B. Fehse

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	1
<b>1.1. Fragestellung</b> .....	1
<b>1.2. Einführung in die hämatopoetische Stammzelltransplantation</b> .....	3
1.2.1. Historischer Überblick.....	3
1.2.2. Die hämatopoetische Stammzelle.....	6
1.2.3. Verschiedene Verfahren der HSCT.....	8
1.2.3.1. Knochenmark.....	8
1.2.3.2. Periphere Blutstammzellen.....	9
1.2.3.3. Nabelschnurblut.....	10
1.2.4. KMT versus PBSC.....	10
1.2.5. Autologe versus allogene HSCT.....	12
1.2.5.1. Autologe HSCT.....	13
1.2.5.2. Allogene HSCT.....	13
<b>1.3. Bedeutung der allogenen PBSC-Spenden</b> .....	14
<b>1.4. Durchflusszytometrie</b> .....	15
<b>2 Material und Methoden</b> .....	17
<b>2.1. Auswahl der Proben</b> .....	17
<b>2.2. Die verschiedene Gruppen</b> .....	17
2.2.1. PBSC allogen 'warm'.....	18
2.2.2. PBSC allogen cryo.....	18
2.2.3. KM allogen cryo.....	18
2.2.4. PBSC autolog cryo.....	19
<b>2.3. Aufbereitung und Messung der Proben</b> .....	19
2.3.1. Gewinnung.....	19
2.3.2. Transport.....	20
2.3.3. Kryopreservation.....	21
2.3.4. Auftauen und messen der Proben.....	22
2.3.5. CFU.....	26
2.3.6. Klinische Daten.....	27
<b>2.4. Statistik</b> .....	27

<b>3 Ergebnisse</b> .....	28
<b>3.1. Transportdauer und Temperatur</b> .....	28
<b>3.2. Ergebnisse der allogenen KM-, allogenen cryo PBSC- und autologen PBSC-Proben</b> .....	29
3.2.1. allogene KM-Proben.....	29
3.2.2. allogene cryo PBSC-Proben.....	32
3.2.3. allogene cryo PBSC-Proben Gruppe I und II.....	34
3.2.4. autologe PBSC-Proben.....	36
<b>3.3. Vergleich der Proben von allogenen cryo PBSC, allogenen KM und autologen PBSC</b> .....	38
3.3.1. Zellkonzentrationen der RBC, PLT und WBC.....	38
3.3.2. CD34 <sup>+</sup> , CD34 <sup>+</sup> 7-AAD <sup>-</sup> und ALDH <sup>br</sup> .....	40
3.3.3. CFU.....	44
<b>4 Diskussion</b> .....	45
<b>4.1. Eigene Ergebnisse</b> .....	45
4.1.1. Transport und Lagerung.....	45
4.1.2. Folgen der Kryopreservation.....	46
4.1.3. ALDH.....	49
<b>4.2. Schlussfolgerungen im internationalen wissenschaftlichen Kontext</b> .....	50
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	53
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	54
<b>7 Tabellen</b> .....	59
<b>8 Anhang</b> .....	65
<b>8.1. Abbildungsverzeichnis</b> .....	65
<b>8.2. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	65
Danksagung.....	67
Erklärung.....	68

# 1 Einleitung

## 1.1. Fragestellung

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) gewinnt zunehmend an Bedeutung. Sie wird bei Leukämien (AML, ALL, CML, MDS/MPS, CLL) und sogenannten lymphoproliferativen Erkrankungen wie dem Multiplen Myelom, Hodgkin und Non-Hodgkin Lymphomen und nicht-malignen Erkrankungen wie aplastischer Anämie, kombinierten Immundefiziten und angeborenen Fehlern wie lysosomale und peroxisomale Speicherkrankheiten eingesetzt. Diese Erkrankungen werden im Regelfall durch Chemotherapie, Bestrahlung, eventuell ergänzend chirurgisch und durch HSCT behandelt. Doch trotz des Erfolges und der Weiterentwicklung von Chemotherapien (z.B. Tyrosinkinase-Inhibitoren bei CML) bleibt die Stammzelltransplantation als einzige kurative Therapie, durch die bei manchen dieser Erkrankungen erst eine volle Genesung ermöglicht wird.

Allein im letzten Jahr wurden weltweit mehr als 50.000 Stammzelltransplantationen durchgeführt, davon 1800 allogene und 2600 autologe HSCT in Deutschland (Ottinger et al. 2006). In der Interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation des UK-Eppendorf/ Hamburg waren es 2006 insgesamt mehr als 150 hämatopoetische Stammzelltransplantationen, davon mehr als 120 allogene periphere Blutstammzell-Transplantation (PBST). Von diesen waren 32% Spender verwandt und dementsprechend 68% unverwandt. Von den insgesamt durchgeführten Transplantationen im UK-Eppendorf war 2006 nur noch bei 11% das Material aus dem Knochenmark (KM) und zu 89% aus dem peripheren Blut (PBSC) nach Stimulation des Knochenmarks entnommen worden.

Sowohl der weltweit vernetzte Pool an Fremdspendern und die wachsende Zahl der HSCT insgesamt, als auch die Verschiebung zu vermehrt allogenen, unverwandten PBSC-Spendern rücken neue Probleme in den Vordergrund.

Erstens bringt der hohe Anteil unverwandter Spender einen längeren Transport und längere Lagerungszeiten mit sich. Wie werden die Zellen über die Zeit beeinflusst? Haben normale Stoffwechselabläufe der Zellen wie anaerobe Glykolyse negative Folgen für das Überleben der Zellen, besonders wenn sie in

hohen Konzentrationen vorliegen und lange Transportzeiten haben? Die größere Zeitspanne und die auch aus dem Transport resultierenden schwierigeren Konditionen wie Temperaturschwankungen und verändertes Milieu der Zellen führen zu der Frage: Wie ist die Qualität der Stammzellen nach dem Transport?

Somit rückt die Qualitätskontrolle der Stammzellpräparate proportional dem Maß der unverwandten Stammzelltransplantationen in den Vordergrund. Die Qualitätsbewertung der Transplantate ist für den Empfänger lebenswichtig, denn eine rechtzeitige Beurteilung des Präparates ermöglicht eine Vorhersage der Ergebnisse und bietet zudem die Möglichkeit frühzeitig zu intervenieren und zusätzliche Maßnahmen zu ergreifen.

Klassischerweise werden zur Bestimmung der Stammzellen Oberflächenmarker (Sutherland 1996 ISHAGE) verwendet und die Koloniebildungsfähigkeit (Colony Forming Unit; CFU) für die Beurteilung der Funktionalität durchgeführt. Da durch Oberflächenmarker nur ein definierter Zelltyp bestimmt wird und die CFU erst nach zwei Wochen ausgewertet werden kann, suchte man nach einer neuen funktionalen Methode, die einerseits so prädikativ ist wie die CFU und andererseits so schnell wie die Messung mit Oberflächenmarkern. Diese fanden Kohn et al. 1985 mit Hilfe des Enzyms Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH), dessen Aktivität bei Stammzellen erhöht ist. Unter Berücksichtigung der herkömmlichen Oberflächenmarker und der ALDH kann eine genauere Selektion der progenitorfähigen Stammzellen nachgewiesen und durch Aldefluor<sup>®</sup> (Stem Cell Technologies, St Katharinen, Germany) als Substrat sichtbar gemacht werden.

Die Qualitätskontrolle durch Aldefluor<sup>®</sup> für Stammzelltransplantate, wie von Lioznov et al. 2005 beschrieben, gilt es in dieser Promotionsarbeit zu erweitern und zu vertiefen sowie statistisch zu verifizieren. Verschiedene Gruppen von Proben wurden untersucht und mit Datensätzen der Patienten in Beziehung gesetzt. Im Besonderen waren die Fragen nach Zusammenhängen von Transporteinfluss, Lagerung, Kryopreservation sowie Zellzahlen der Proben, Zeit bis zur hämatologischen Rekonstitution, Vollständigkeit des Engraftments (hämatologischer Spender Chimärismus), Rezidiv und Langzeitüberleben der Patienten von Interesse.

## 1.2. Einführung in die Stammzelltransplantation

Schon im 19. Jahrhundert wurden Menschen mit Knochenmark behandelt. Heutzutage gehört die Stammzelltransplantation bei bestimmten Erkrankungen zum Standard der Behandlung.

### 1.2.1. Historischer Überblick

Der russische Arzt Alexander Bogdanov veröffentlichte 1909 in einer deutschen Zeitschrift einen Artikel mit der Überschrift ‚Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere‘ (aus Martin und Hoelzer 2002). Mit diesem Artikel war die Idee der Stammzelle in der Öffentlichkeit erstmals bekannt geworden.

Knapp vierzig Jahre später bekam die Frage der Regeneration von Stammzellen eine neue große Bedeutung im geschichtlichen Zusammenhang mit dem Abwurf der Atombomben über Hiroshima und Nagasaki. Die ionisierende Strahlung zeigte schnell die verheerenden Folgen für das blutbildende System.

Von da an ging die Erforschung der Regeneration und Neubildung sowie Therapien zum Ersatz des blutbildenden Systems in großen Schritten voran. Jacobsen et al. zeigten 1949 an Mäusen, dass eine Ganzkörperbestrahlung überlebt werden kann, wenn die Milz abgeschirmt wird. Dieser empirische Befund, dessen Mechanismus noch nicht klar einzuordnen war, wurde von Lorenz et al. 1951 in der Form aufgegriffen, dass sie im Umkehrschluss Zellen intravenös applizierten und dadurch die Versuchstiere retten konnten, die sonst durch die Ganzkörperbestrahlung gestorben wären. Dies zeigte, dass es bestimmte Zellen geben muss, die ein selbstregenerierendes und gleichzeitig Differenzierungspotential besitzen müssen. 1955 entdeckte Trentin, dass nach einer Ganzkörperbestrahlung von Mäusen mit anschließender Knochenmarktransplantation ein Hauttransplantat von dem gleichen Spender nicht abgestoßen wurde, während ein Hauttransplantat eines anderen Spenders abgestoßen wurde. So war der Beweis erbracht, dass die Immunzellen des

Spenderknochenmarks das Immunsystem des Empfängers übernehmen und ein anschließendes Hauttransplantat nicht abgestoßen wird. Handelte es sich um verschiedene Spender, wurde das Transplantat abgestoßen.

Die erste Beschreibung der sogenannten Graft-versus-Host-Disease (GvHD), Spender-gegen-Wirt-Reaktion, erfolgte 1960 (Spitzer 2000). Dabei handelt es sich um die ungewollte Immunreaktion des Transplantates gegen den Empfänger, die an verschiedenen Organen auftritt und Erscheinungsformen von sehr leichter Ausprägung bis hin zu fulminanten Verläufen aufweisen kann. Die GvHD spielt bis heute in der allogenen Stammzelltransplantation eine große Rolle, da sie im Gleichgewicht sein muss mit dem gewollten Graft-versus-Leukemia (GvL) Effekt, der die Immunkompetenz des Transplantats gegen die Krankheit nutzt.

So beschäftigte sich Borell schon 1962 mit diesem Problem und entdeckte das Immunsuppressivum Ciclosporin A, das dann von Storb et al. 1986 aufgegriffen wurde und bis heute in Kombination mit Methotrexat zur GvHD-Prophylaxe eingesetzt wird. Doch trotz der Immunsuppression mussten noch weitere Faktoren zum Gelingen einer Transplantation beitragen. Thomas et al. beschäftigten sich weiter mit der Behandlung erkrankter Menschen und vollzogen 1957 die ersten HSCT bei Menschen anschließend an Behandlungen mit Chemotherapie und Bestrahlung.

Epstein und Storb entdeckten 1968 im Hundemodell, dass eine Gewebetypisierung, in der Spender und Empfänger zueinander passen ein entscheidender Faktor für ein Gelingen der Transplantation ist. Heute ist bekannt, dass dieses sogenannte Humane-Leukozyten-Antigen (HLA) die entscheidende Rolle für den Erfolg einer Transplantation spielt. Um nun eine möglichst hohe Anzahl von Stammzellen in einem Transplantat zu erhalten, war es wichtig ein Kriterium zu finden, das diese Zellen von anderen unterscheidet, denn morphologisch ist dies nicht eindeutig möglich. So entdeckten 1984 Civin et al., dass diese Zellen bestimmte Oberflächenmarker haben, die sie in ihrer weiteren Differenzierung nicht mehr exprimieren. So können die Stammzellen durch diese Oberflächenmarker mit großer Sicherheit als Zellen identifiziert werden, die Stammzeleigenschaften, sowohl Proliferative- als auch Differenzierungsfähigkeiten, besitzen. Dieser Oberflächenmarker CD34,

zusammen mit anderen (CD45, u.a.) wird bis heute benutzt, um die Stammzellen zu identifizieren.

Reiffers gelang es 1985 erstmals, einen Patienten mit akuter Leukämie mit autologen peripheren Blutstammzellen erfolgreich zu transplantieren. Nicht nur im Knochenmark und im peripheren Blut, sondern auch in Nabelschnurblut (UCB) konnten hämatopoetische Stammzellen nachgewiesen werden. Der schon oben erwähnte GvL-Effekt, den man sich wünscht, wurde 1990 von Kolb et al. weiterentwickelt, so dass sie die heute inzwischen häufig angewandte Methode der Donor-Lymphozyten-Infusion (DLI), einer Infusion von extra gesammelten Lymphozyten des Spenders für den Empfänger, etablierten. Diese neue Entdeckung konnte von Storb 1997 und Slavin 1998 in Form von RIC-Transplantationen (reduced intensity conditioning regimen) weiter entwickelt werden, bei denen hämatopoetische Stammzellen infundiert und so der anti-neoplastische Effekt, der auf einer immunologischen Reaktion beruht, ausgenutzt wird. Die Konditionierung vor einer Transplantation kann somit abgemildert werden in eine nicht myeloablative Therapie mit geringerer Toxizität. Dies ermöglicht es die Indikationsstellung einer HSCT zu erweitern, da somit auch ältere und komorbide Patienten transplantiert werden können.

Auch auf dem Gebiet der Differenzierung wurde weitergeforscht. So entdeckten Kohn et al. 1985 bei Stammzellen von Mäusen eine erhöhte Aktivität des Enzyms Aldehyd-Dehydrogenase. Nachdem es auch beim Menschen nachgewiesen wurde, zeigte sich eine große Übereinstimmung der Zellen, die sowohl  $CD34^+$  als auch  $SSC^{low}ALDH^{br}$  waren. Nachdem das Einfrieren der Präparate häufiger praktiziert wurde, stellte sich die Frage nach den Konsequenzen für die Präparate, so dass Lioznov et al. 2005 exemplarisch entdeckten, dass nur die Zahl der transplantierten  $SSC^{low}ALDH^{br}$  Zellen nach dem Einfrieren und Auftauen mit der CFU und dem Engraftment der Patienten signifikant korrelieren,  $CD34^+$  Zellen jedoch nicht so exakt.

Viele Studien sind seitdem gemacht worden, die jedoch noch kein abschließendes Ergebnis liefern konnten zur individuell am besten geeigneten reduzierten Konditionierung und zur sicheren qualitativen Bestimmung der Präparate besonders nach Kryopreservation und anschließendem Auftauen. Auch die Therapie (Immunsuppression, antivirale Therapie, Antimykotika, DLI) nach der Transplantation ist immer weiter verbessert worden, jedoch wird

immer noch weiter geforscht, um die Balance von GvHD und dem GvL-Effekt zu optimieren. In den letzten Jahren wird vermehrt auch an den Möglichkeiten geforscht, gentherapeutisch einzugreifen.

1909	Maximow	Entdeckung der Stammzelle
1949	Jacobsen	Milzschutz in der Maus
1951	Lorenz	Stammzellinfusion
1957	Thomas	erste allogene BMT
1962	Goodmann	Periphere Blutstammzelle in der Maus
1962	Borrell	Entwicklung des Ciclosporin A
1968	Epstein	Bedeutung der Gewebetypisierung im Hundemodell
1969	Thomas	Allogene BMT bei Immundefekt
1980	Hansen	Transplantation von unverwandtem Spender
1984	Civin	CD 34-Antigen Identifizierung
1985	Reiffers	Erfolgreiche autologe PBSCT bei akuter Leukämie
1985	Kohn	hohe ALDH-Aktivität in HSC bei Mäusen
1986	Storb	GvHD Prophylaxe mit Methotrexat und Ciclosporin A
1989	Gluckmann	Transplantation mit Nabelschnurblut
1990	Kolb	Kurative Effekt der Spenderlymphozyteninfusion (DLI)
1997	Storb	RIC-Transplantation
1998	Kessinger	erste allogene PBSC
1998	Slavin	Nicht-myeloablative Transplantation
1999	Storms	Aldefluor als Marker für ALDH

Tab. 1. Meilensteine der hämatopoetischen Stammzelltransplantation und Entwicklung der Qualitätskontrolle vom Transplantat

### 1.2.2. Die hämatopoetische Stammzelle

Stammzellen sind Zellen, die das Leben und Überleben erst ermöglichen. Ihre Besonderheit liegt grundsätzlich darin, dass sie zwei Eigenschaften haben, die sie von anderen Zellen unterscheiden. Teilt sich eine Stammzelle, so ist das eine asynchrone Teilung, da die eine Tochterzelle wieder eine Stammzelle ist und die andere Tochterzelle sich weiterdifferenziert zu einer spezialisierten Zelle. Diesen Zelltyp nennt man Progenitorzellen, da sie erst verschiedene Phasen durchlaufen, bis sie enddifferenzierte Zellen sind. Des Weiteren wird unterschieden zwischen embryonalen Stammzellen, die pluripotent sind, das heißt sich in jede Zellart differenzieren können und postembryonalen (fötalen, neonatalen, adulten) Stammzellen, die jeder Mensch hat und die für die Nachbildung eines bestimmten Zelltyps verantwortlich sind. In dieser Arbeit geht es ausschließlich um diese adulten Stammzellen.

Die Stammzellen für das blutbildende System befinden sich zum größten Teil im Knochenmark. Ihr Anteil macht dort etwa 1 - 4% der mononukleären Zellen aus. Im Knochenmark befinden sich außerdem noch Progenitorzellen, mesenchymale Stromazellen und Fettzellen, die gemeinsam ein geeignetes Umfeld für die Stammzellen und deren Funktion zu bilden scheinen. Morphologisch lässt sich die Stammzelle nicht eindeutig von den anderen mononukleären Zellen des Knochenmarks unterscheiden. Als Merkmale zur Bestimmung der HSC haben sich immunzytochemische Merkmale, wie  $CD34^+$ ,  $CD38^-$ ,  $CD33^-$ ,  $CD90^+$  (Thy-1),  $CD133^+$ ,  $lin^-$  u.a. durchgesetzt, wobei unter  $lin^-$  das Fehlen weiterer zellliniendefinierender Antigene gemeint ist. Doch auch das Enzym ALDH gewinnt zunehmend an Bedeutung (s.o.) und im Tierversuch wurde der c-kit-Rezeptor (CD117) als ein den Stammzellen wahrscheinlich zuzuordnender Rezeptor entdeckt.

Wichtig für die Gewinnung und Beurteilung der Viabilität für Stammzellen ebenso wie für Zellen im Allgemeinen ist das Erfassen der Membranintegrität. Eine bis heute angewandte Methode ist das Färben mit Trypan-Blau, bei welcher Zellen mit defekter Zellmembran, d.h. tote Zellen, sich blau verfärben und dies unter dem Mikroskop quantitativ ausgezählt werden kann. Auf ähnliche Weise wird das Propidiumiodid eingesetzt, welches sich bei einer defekten Zellmembran an die DNA binden und durch Fluoreszenz quantitativ erfasst werden kann. Das heutzutage am meisten eingesetzte Verfahren zum Feststellen apoptotischer und toter Zellen ist die Verwendung des Peptids 7-AAD (7-Aminoactinomycin), das eine dem Propidiumiodid sehr ähnliche Wirkweise hat. Eine weitere neuere Methode, die zusätzlich zu 7-AAD angewandt wird, ist das Annexin V, das schon früh apoptotische Zellen erkennen lässt, die noch 7-AAD negativ sind.

Diese herkömmlichen Methoden dienen alle der Beurteilung der Zellmembranintegrität, jedoch nicht der tatsächlichen funktionalen Stammzellefähigkeit welche mit der ALDH beurteilt werden kann, da das Enzym nur bei vollständig intakten Stammzellen das hinzugefügte Substrat Aldefluor<sup>®</sup> umsetzt und dieses dann in der Durchflusszytometrie gemessen werden kann. Ist die Funktionalität einer Stammzelle eingeschränkt, ihre Zellmembran aber noch intakt, so wird sie mit den herkömmlichen Methoden nicht als beschädigt herausgefiltert, aber mit Aldefluor<sup>®</sup>. Das Enzym ALDH kommt hauptsächlich in

der Leber, aber auch in HSC vor. Es wird benötigt, um Retinol (Vitamin A) in Retinsäure zu oxydieren. Chute et al. zeigten 2006, dass diese Oxydation sowohl im Zusammenhang mit intrazellulären Reparaturmechanismen als auch Differenzierung zu Progenitorzellen steht, denn im Umkehrschluss konnte er beweisen, dass eine Hemmung der ALDH durch Diethylaminobenzaldehyd (DEAB) eine erhöhte Rate an sich selbst erneuernden HSC hervorbringt, die noch keine Differenzierung zu Progenitoren durchlaufen haben.

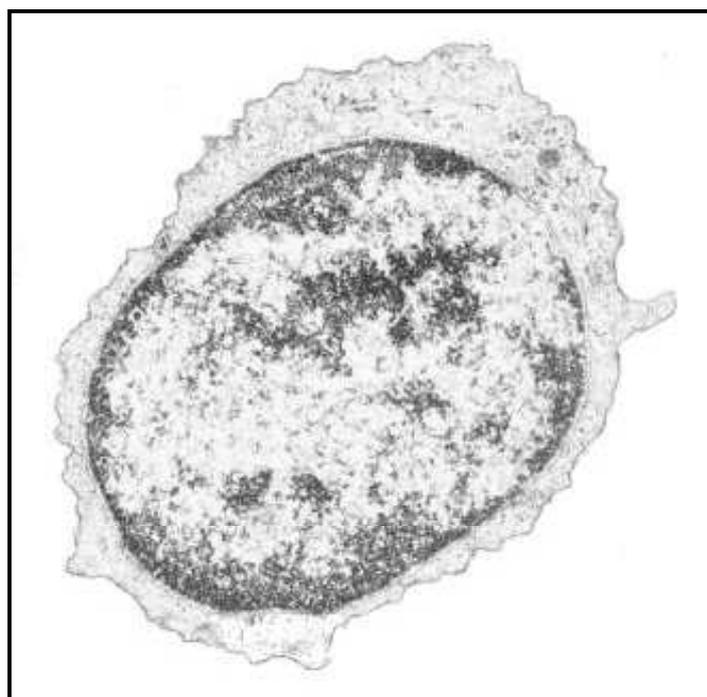


Abb.1. Hämatopoetische Stammzelle

### 1.2.3. Verschiedene Verfahren der HSCT

#### 1.2.3.1. Knochenmark

Die Entnahme von Knochenmark ist das älteste Verfahren, Stammzellen für Transplantationen sowie für die Forschung zu gewinnen. Die Zielmenge von  $2-3 \times 10^6$  nukleären Zellen pro Kilogramm Körpergewicht (KG) wird im Regelfall erreicht, wenn 10-15 ml/kg KG entnommen werden. Hierfür bekommen die Spender eine Vollnarkose und es wird unter sterilen Bedingungen mehrmals der Beckenkamm punktiert und das Knochenmark aspiriert, bis das Zielvolumen erreicht ist. Zur Sicherheit bleiben die Spender bei komplikationslosem Verlauf einen Tag stationär, um unter Beobachtung zu sein, falls sich insgesamt selten

auftretende Probleme ergeben wie anästhesiologische Komplikationen, lokale Infektionen, Hämatome, postoperatives Fieber oder sehr selten Knochenbrüche des Beckens. Das Präparat wird in heparinisierten Behältern aufgefangen, durchläuft mehrere Waschgänge und muss je nach ABO-Kompatibilität von Empfänger und Spender noch gesondert aufbereitet werden. Kann das Präparat nicht frisch intravenös gegeben werden, z.B. weil der Patient noch konditioniert wird, der Spender nur zu einem früheren Zeitpunkt kann oder sonstige unvorhergesehene Ereignisse eintreten, so ist es nötig das Präparat einzufrieren wie unter 2.3.3 näher beschrieben. Direkt vor der Transplantation wird das Präparat dann in 37° C warmem Wasserbad aufgetaut und nach einem Bedside-Test (HSC-Präparate, auch autologe, unterliegen dem Gesetz der Bluttransfusion) intravenös transfundiert.

### 1.2.3.2. Periphere Blutstammzelle

Seit 1998 (Goldman et al.) ist eine zweite Möglichkeit der Gewinnung von Stammzellen immer mehr verwirklicht worden, nämlich das Ernten von PBSC die durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren (G-CSF oder GM-CSF) stimuliert in die periphere Blutbahn übergehen und dort durch Zellseparation gewonnen werden können. Der genaue Mechanismus ist derzeit noch nicht gänzlich geklärt, soll aber über eine Kettenreaktion (G-CSF → Neutrophile → Serin-Proteasen+neutrophile-Elastase+Catepsin-G → VCAM-1 → HSC) zur vermehrten Freisetzung der HSC führen.

Bei dieser Gewinnungsmethode spritzt sich der Spender fünf bis sechs Tage den Wachstumsfaktor täglich subcutan. Am Tag fünf, wenn die höchste Konzentration (ca 100-fach erhöhte Konzentration der CD34<sup>+</sup> Zellen) von HSC im peripheren Blut erreicht ist, erfolgt die Kollektionierung durch einen Zellseparator, in welchem mononukleäre Zellen durch Zentrifugation herausgefiltert und separiert werden können (Leukapherese). Die übrigen Bestandteile des Blutes werden wieder zurück zum Spender geleitet. Der Zu- und Ablauf zum Separator läuft entweder über einen doppelumigen zentralen Venenkatheder oder zwei separate periphere Zugänge. Durch die kontinuierliche Flussrate kommt es selten zu kreislaufinstabilen Situationen. Das beigefügte Citrat zur Gerinnungshemmung im extrakorporalen Blut kann

mitunter eine Hypokalzämie hervorrufen, die aber während der Leukapherese durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Perfusor ausgeglichen werden kann. Des Weiteren treten mitunter Hypothermien auf, die symptomatisch behoben werden. Infektionen sind sehr selten, da der Separator ein steriles Einmalsystem benutzt; am ehesten kann eine Infektion durch die Einstichstellen der intravenösen Zugänge erfolgen. Die Nebenwirkungen des G-CSF sind sehr verschieden und reichen von minimal, (Müdigkeit) über mittelgradig (Glieder-, Knochen- und Kopfschmerzen) bis zu schwersten Komplikationen (Thrombembolie, Milzruptur, anaphylaktische Reaktion), die aber ausgesprochen selten sind.

### 1.2.3.3. Nabelschnurblut

Die dritte Möglichkeit Stammzellen zu gewinnen besteht darin, Nabelschnurblut, (UCB) aufzubereiten und zu transplantieren. Die natürliche Konzentration mononukleärer Zellen im UCB beträgt etwa  $15 \times 10^6/\text{ml}$ , wie Gluckmann et al. 1989 zeigten. Dennoch sind die Datenbanken für UCB im Vergleich zu registrierten Lebendspendern klein, sowie das Volumen an HSC, das gewonnen werden kann für Erwachsene häufig nicht ausreichend, da die Anzahl transplanteder Zellen für das Überleben entscheidend ist. Geeignet sind HSC von UCB zur Rekonstitution der Hämatopoese nach allogener Transplantation. Ein Vorteil gegenüber PBSC und KM ist die deutlich niedrigere Proliferationsrate der T-Zellen in den UCB Transplantaten, welche für die GvHD mitverantwortlich sind. Kinder hatten ein besseres Überleben bei UCB Transplantationen im Vergleich zu Erwachsenen, doch im Vergleich zu KMT bei Kindern war das Ergebnis der UCB Transplantation signifikant schlechter (Rubinstein et al. 1998 und Rocha et al. 2001).

### 1.2.4. KMT versus PBSCT

Wie unter 1.2.3. beschrieben gibt es verschiedene Möglichkeiten der Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen. Abbildung 2. macht deutlich, wie die Transplantation der peripheren Blutstammzellen im Vergleich zum Knochenmark immer mehr zugenommen hat.

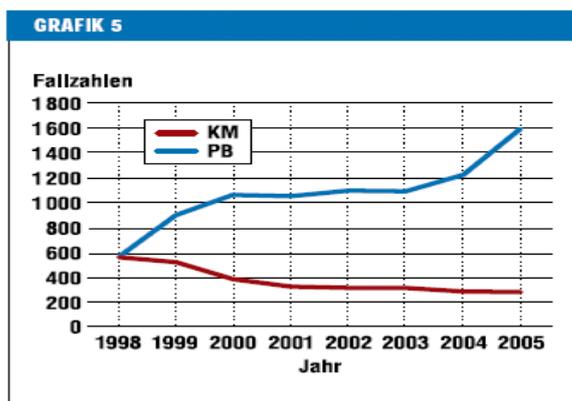


Abb. 2.: Nutzung von Knochenmark (KM) und peripheren Blutstammzellen (PB) als Stammzellquelle für die allogene HSZT in Deutschland im Zeitraum von 1998 – 2005 (Ottinger et al. 2006)

Diese Verschiebung hat am ehesten den Hintergrund, dass die Gewinnung der Stammzellen für den Spender angenehmer ist, da er keine stationäre Aufnahme und keine Vollnarkose braucht.

Vergleicht man die Stammzellen aus dem Knochenmark und die des peripher gewonnenen Blutes, so können einige Unterschiede festgestellt werden. Die Stammzellen des Knochenmarks werden direkt aus ihrer natürlichen Umgebung gewonnen im Gegensatz zu den PBSC, die durch künstliche Stimulation sich einerseits in ein ihnen nicht natürliches Milieu begeben, nämlich das Blut, wo ihnen das Stroma keinen Schutz mehr gibt und wo sie andererseits auch nach relativ kurzer Zeit (5 Tage) ihrer Entstehung schon durch Leukapherese herausgeschwemmt werden.

Der Vergleich klinischer Parameter beruht auf Studien, die retrospektiv erstellt wurden. Tabelle 2 vergleicht einige der wichtigen Parameter zwischen Knochenmark-Stammzellen und peripheren Blutstammzellen. Im Einzelnen lässt sich feststellen, dass PBSC ein schnelleres Engraftment haben. Noch beruhen die Zielmengen der CD34<sup>+</sup> Zellen der PBSC-Präparate auf Erfahrungswerten ( $>2 \times 10^6$  bis  $<10 \times 10^6$ /kg Körpergewicht des Empfängers). Auch außerhalb dieser Richtwerte waren Transplantationen mit zufriedenstellenden Ergebnissen erzielt worden. Diese Richtwerte gelten in erster Linie für allogene Spender, da bei autologen PBSC schon bei geringeren Zellzahlen ein erfolgreiches Engraftment beobachtet werden kann.

<b>Merkmal</b>	<b>KM</b>	<b>PBSC</b>
Stimulation	-	+
'Stress' für die HSC	+	++
nötige CD34+ Konzentration	+	++
Narkose	+	-
Stationär	+	-
aGvHD	+	++
cGvHD	+	++
Engraftment von Leukozyten und PLT	+	++
Lymphozytenrekonstitution	+	++
schnellere Rekonstitution des Immunsystems	+	++
Rezidivwahrscheinlichkeit	++	+
Graft failure	+	+

Tab. 2. Vergleich von KMT und PBSC (z.T. Kröger et Zander 2004)

Das bessere Engraftment der Neutrophilen Zellen sowie die schnellere Rekonstitution des Immunsystems bei PBSC kommt von der signifikant höheren Zahl der Lymphozyten in den Präparaten, das andererseits zu einer erhöhten Inzidenz von akuter und chronischer (Manifestation nach Tag 100 nach HSCT) GvHD führt. Daher ist ein Abwägen wichtig und erklärt die Grenzwerte für die PBSC-Präparate. Jedoch konnte keine Studie eine eindeutige Beweislage zum primären Transplantatversagen liefern in Bezug auf die Herkunft der Stammzellen, PBSC versus KM. Dies gilt nur für allogene, 'gematchte' Spender, da bei 'mismatched' Spendern ein 'graft failure' am ehesten durch das HLA-Mismatch hervorgerufen wird.

### 1.2.5. Autologe versus allogene HSCT

Es gibt grundsätzlich drei Arten von Spendern für die HSCT. Bei der autologen Transplantation sind Spender und Empfänger die selbe Person im Gegensatz zur allogenen Transplantation, bei welcher Spender und Empfänger zwei verschiedene Individuen sind. Ein Spezialfall ist die Transplantation syngener (genetisch identisch) Zwillinge, die als eigene Gruppe verstanden werden kann.

### 1.2.5.1. Autologe HSCT

Eine autologe HSCT erfolgt meist als PBSCT, da so die Stammzellen wie unter 1.2.3.2. beschrieben leichter herausgefiltert werden können. Die Indikationsstellung der autologen HSCT erfolgt nach den Richtlinien der *European Group for Blood and Marrow Transplantation* (EBMT). Ob der Patient vor der Transplantation eine Konditionierung (Chemotherapie) durchläuft, wird auch nach den Richtlinien der EBMT entschieden. In jedem Fall erfolgt eine Stimulation der HSC im Knochenmark durch G-CSF wie bei gesunden Spendern. Nach ausreichender Anzahl CD34<sup>+</sup>-Zellen im peripheren Blut werden die PBSC entnommen (s.o.). Anschließend bekommen die Patienten eine Chemotherapie und/oder eine Radiatio, die sich nach der Krankheit, dem Stadium der Erkrankung, Alter, Komorbidität und vielen weiteren Faktoren richtet. Erst dann wird die HSCT zur schnelleren Regeneration des Knochenmarks und seiner Regenerationsfähigkeit durch die Stammzellen durchgeführt.

### 1.2.5.2. Allogene HSCT

Bei der allogenen Stammzelltransplantation wird bei den Spendern unterschieden zwischen genotypisch HLA-identischen Geschwistern, die weltweit als bestgeeignete Spender gelten, HLA-kompatiblen Fremdspendern, HLA-identischen oder partiell identischen Familienspendern außer Geschwistern, haplo-identischen Spendern (Eltern) und Nabelschnurblut. Steht kein HLA-identisches Geschwister und auch in der Verwandtschaft kein geeigneter Spender zur Verfügung, so wird in dem weltweit vernetzten Pool nach einem passenden Spender gesucht.

Dabei spielen verschiedene Faktoren mit herein. An wichtigster Stelle steht eine möglichst hohe Übereinstimmung der HLA-Merkmale, wobei eine molekulargenetische Übereinstimmung der HLA-A- und -B-Allele (zweistellig) und der HLA-DRB1- und -DQB1-Allele (vierstellig) gefordert wird. Die HLA-Antigene teilen sich auf in Klasse I-Antigene, HLA-A, -B und -Cw sowie Klasse II-Antigene, HLA-DR, -DQ und -DP. Mismatche in den Klasse II-Antigenen zeigten ein höheres Auftreten von GvHD. Ist der Fremdspender HLA-

kompatibel, so sinkt das Risiko, eine GvHD zu entwickeln auf das gleiche Niveau wie bei verwandten Spendern.

Ein weiterer Faktor für die Kompatibilität von Spender und Empfänger ist die CMV-Serologie (Zytomegalievirus). Ein CMV positiver Patient sollte möglichst mit einem CMV positiven Stammzellpräparat transplantiert werden, da es unter der Immunsuppression zu einer Reaktivierung einer CMV-Infektion kommen kann, der ein Spenderimmunsystem schon vorher gebildete Antikörper entgegen setzen kann. Bei CMV negativen Empfängern spielt der Status des Spenders keine wesentliche Rolle, da eine Neuinfektion durch ein CMV positives Präparat sehr unwahrscheinlich ist.

Das Alter des Empfängers und die Kombination männlicher Empfänger und weiblicher Spender spielen auch eine negative Rolle bei der Entwicklung einer GvHD.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass verwandte Spender, besonders HLA-identische Geschwister geeigneter Spender sind, da die Gefahr der aGvHD und cGvHD sinkt.

### **1.3. Bedeutung der allogenen PBSC-Spenden**

Die gesamte Entwicklung hin zu allogenen PBSC-Spendern in der Stammzelltransplantation, bringt veränderte Bedingungen mit sich. Die Bedeutung des Transportes muss genauer untersucht werden, sowie genauere Daten zu der Veränderung der Zellen selbst und ihres Transportmediums. Welche Veränderungen geschehen durch verlängerte Transportzeiten und welche Rolle spielt die Temperatur und Schwankungen die den empfohlenen Bereich überschreiten. Sind die Veränderungen von negativer Bedeutung für die Stammzellen und mit welchen Maßnahmen lässt sich dagegen steuern um einerseits das Leben der Empfänger nicht zu riskieren und andererseits trotzdem den weltweiten Pool an Fremdspendern nutzen zu können. Wie sehr sind die einzelnen Faktoren abhängig voneinander und welches Gewicht hat jeder einzelne Faktor bei der Verschlechterung der Präparate.

### 1.3. Durchflusszytometrie

Wallace Coulter legte 1949 (facslab uni mainz, 2006) die Grundlagen für die Durchflusszytometrie. Diese, auch FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) genannte Technik, dient der quantitativen Messung von mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Teilen von Zellen. Es können sowohl Oberflächenmoleküle als auch intrazelluläre Moleküle nachgewiesen werden. Des Weiteren können durch Anfärben der RNA und DNA Stadien des Zellzyklus und Apoptose festgestellt werden. In dieser Arbeit kamen ausschließlich die genannten Methoden zur Anwendung, deswegen soll auf die weitere Nennung der möglichen der FACS-Anwendungen verzichtet werden.

Die Messung der Zellen erfolgt während sie in einem Flüssigkeitsstrom einzeln einen Laserstrahl passieren. Dabei können Streulicht und Emissionsspektren bestimmt werden.

Das Durchflusszytometer (FACS-Calibur, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland), das für diese Arbeit ausschließlich zur Anwendung kam, ist mit einem Argonlaser von 488nm und einer Laserdiode von 633nm ausgestattet. Die Farbstoffe werden zwar von der gleichen Wellenlänge absorbiert, das Emissionsspektrum der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe unterscheidet sich jedoch so deutlich, dass Fluoreszenzsignale detektiert und somit voneinander getrennt wiedergegeben werden können, da sie proportional zur Zahl der Fluorochrommoleküle auf oder in der Zelle/Partikel sind. Somit ist die Messung mit vier Fluoreszenzfarbstoffen gleichzeitig möglich.

Durch die Bestimmung des Streulichtes können Partikelgröße, relative Granularität und interne Komplexität sowie die relative Fluoreszenzintensität bestimmt werden. Die Lichtstreuung, ausgelöst durch einen Partikel einer kolloidalen Lösung, entsteht durch die Ablenkung des Laserstrahls und ist abhängig von der Größe und internen Komplexität des Partikels. Anhand des Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) kann die Zelloberfläche oder -größe bestimmt werden. Da jeder Partikel ein Signal erzeugt, kann ein Schwellenwert (Threshold) bestimmt werden, der Zellen über dem Schwellenwert misst. Das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) gibt Auskunft über die interne Komplexität von Zellen, durch die das Licht gebrochene und reflektiert wird.

Dieses wird dann vom Durchflusszytometer gebündelt und kann dann bestimmt werden.

Die Bestimmung von FSC und SSC ermöglicht die Detektion verschiedener Zelltypen und, in Kombination mit den Fluoreszenz markierten Antikörpern für Oberflächenmoleküle (CD34, CD45, u.a.), Substrat für intrazelluläre Enzyme (Aldefluor<sup>®</sup>) und DNA-bindenden Antikörpern (7-AAD, u.a.), auch die Bestimmung von spezifischen Eigenschaften der Zellpopulationen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1. Auswahl der Proben

Die Auswahl der einzelnen Patientengruppen, die im Rahmen dieser Arbeit erfasst und deren Proben untersucht wurden, beruht auf verschiedenen Gesichtspunkten. Die erste Auswahl hatte zum Kriterium, allogene PBSC-Präparate mit langer Transportzeit und –weg auf deren Qualität hin zu vergleichen mit allogenen PBSC-Präparaten, die von näher gelegenen Zentren innerhalb Europas geschickt wurden und die beide ohne Kryopreservation den Patienten gegeben wurden. Das zweite Kollektiv umfasst allogene PBSC-Präparate, die vor der HSCT eingefroren werden mussten. Die dritte Gruppe sind allogene KM-Präparate, die auch vor der Gabe eingefroren wurden. Der letzte Teil sind autologe PBSC-Proben und dient als Vergleichsgruppe, da diese standardmäßig eingefroren wurden.

### 2.2. Die verschiedenen Gruppen

Die Unterschiede der einzelnen Gruppen sollen in den folgenden Unterkapiteln beschrieben werden. Gemeinsam ist allen Gruppen, dass jeweils die Pilotröhrchen der Präparate gemessen wurden, die in extra Küvetten zu je 1ml zu den gleichen Bedingungen wie die Präparate für die HSCT eingefroren worden waren.

Die im Folgenden genannten Daten sind in allen Gruppen erhoben worden: Tag der Spende und Tag des Einfrierens, Zellzahlen vor dem Einfrieren der Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten und CD34<sup>+</sup>-Zellen in Prozent. Nach dem Einfrieren und wieder Auftauen wurde sowohl die Zellzahl der CD34<sup>+</sup>-Zellen in Prozent und die Membranintegrität der CD34<sup>+</sup>-Zellen, als auch die Zellzahl mittels 7AAD und zusätzlich die SSC<sup>lo</sup>ALDH<sup>br</sup>-Zellen bestimmt. An klinischen Parametern galt es die Diagnosen, das Datum der HSCT und das Engraftment zu erheben. Alle Patienten wurden in der Klinik für Stammzelltransplantation im UK-Eppendorf/Hamburg transplantiert und lagen in Zimmern mit laminarem Luftstrom.

Die Daten, die in den jeweiligen Gruppen zusätzlich erhoben wurden werden dort gesondert aufgeführt.

### **2.2.1. PBSC allogene 'warm'**

Diese Gruppe von allogenen PBSC-Präparaten umfasst 62 Proben. Die Proben wurden als Pilotröhrchen mit einem Volumen von ca 1ml eingefroren, während die Präparate den Patienten ‚warm‘, das heißt ohne Kryopreservation, gegeben wurden. Davon waren 8 Proben aus Ländern jenseits Europas. Im Folgenden werden diese Proben allogene ‚warme‘ PBSC-Proben genannt, um sie von der zweiten Gruppe allogener PBSC Proben zu unterscheiden.

### **2.2.2. PBSC allogene cryo**

Da das Einfrieren von allogenen Präparaten nur in Ausnahmefällen erlaubt ist, war die Anzahl der Proben, die für die Erhebung der Daten zur Verfügung standen, limitiert. Insgesamt ließen sich 35 allogene PBSC Proben messen, die zwischen 2000 und 2007 eingefroren worden waren. Drei der Patienten sind vor der HSCT verstorben, so dass sich diese Gruppe auf 32 Proben reduziert hat. Des Weiteren wurde erhoben, ob die Spender verwandt respektive unverwandt waren. Auch die CFU vor und nach Kryopreservation wurde gemessen. Ebenso wurde berücksichtigt, ob die Patienten eine Standardkonditionierung vor der Transplantation durchlaufen haben oder ob eine reduzierte Konditionierung stattgefunden hat. Der Spender Chimärismus, das Auftreten eines Rezidivs und das Überleben mit Stichtag 1.7.2007 wurden gleichermaßen als Daten erhoben. Diese Gruppe von Daten soll im Folgenden allogene cryo PBSC genannt werden, um sie von der oben genannten allogenen ‚warmen‘ PBSC Gruppe abzugrenzen.

### **2.2.3. KM allogene cryo**

In dem Zeitraum der Jahre 2000 bis 2007 mussten 13 allogene KM-Präparate aus logistischen und medizinischen Gründen eingefroren werden. Die Pilotröhrchen wurden gemessen und die Daten, wie oben beschrieben,

erhoben. An klinischen Daten wurde zusätzlich zu den oben genannten noch erhoben, ob die Spender mit den Empfängern verwandt oder unverwandt waren, außerdem die CFU vor und nach der Kryopreservation sowie der Konditionierungstyp (standard oder reduziert) und der Spender Chimärismus.

### 2.2.4. PBSC autolog cryo

Die Gruppe der autologen Präparate (n = 19) dient als eine bedingte Referenzgruppe, denn diese Präparate sind im UK-Eppendorf/ Hamburg vom Institut für Transfusionsmedizin eingefroren worden, wie Sputtek et al. 1997 und 2004 beschrieben haben. Somit haben sie alle das gleiche Prozedere durchlaufen. Alle Proben stammen von Patienten mit multiplem Myelom, um die Unterschiede, die die verschiedenen Erkrankungen und somit auch sehr unterschiedlichen Behandlungen mit sich bringen, möglichst gering zu halten. Der Zeitraum der Proben umfasst knapp zwei Jahre (1/2005 bis 12/2006). Die Proben für autologe Transplantationen werden fast immer eingefroren, da die Patienten nach dem Ernten der Stammzellen konditioniert und anschließend transplantiert werden. Die Pilotröhrchen, ca 1ml pro Röhrchen, wurden parallel zu den Präparaten eingefroren.

## 2.3. Aufbereitung und Messung der Proben

### 2.3.1. Gewinnung

Stellt sich bei einem Patienten die Indikation für eine Stammzelltransplantation, so muss ein geeigneter Spender gefunden werden. Wie oben beschrieben eignen sich Geschwister am besten. Ist dies nicht möglich und kommt auch kein geeigneter Spender in der weiteren Familie in Frage, so wird nach einem unverwandten passenden Spender gesucht, was von einem im internistischen/pädiatrischen hämatologisch-/onkologischen Bereich tätigen Arzt erfolgen muss, der den Patienten zumindest mitbehandelt. Der Auftrag geht an das *Zentrale Knochenmarkspenderegister für Deutschland* (ZKRD), nachdem der HLA-Typ des Patienten durch zwei unabhängige Blutproben bestätigt wurde. Ist in den Datenbanken, national oder international (DKMS,

NMDP, BMDW, ABMDR, u.a.) ein immungenetisch passender Spender gefunden, so wird bei dem Transplantationszentrum, wo der Spender registriert ist, angefragt. Dieses übernimmt dann das weitere Prozedere für den Spender. Es wird von dort Kontakt mit ihm aufgenommen, seine Bereitschaft zu spenden geklärt und sein Gesundheitszustand überprüft. Des Weiteren wird nochmals eine genaue HLA-Typisierung in einem Histokompatibilitäts-Labor, das von der EFI (*Federation of Immunogenetics*) oder ASHI (*American Society for Histocompatibility and Immunogenetics*) dafür zugelassen ist, durchgeführt und das Blut auf Infektionsmarker für Hepatitis B und C, HIV, HTLV, Toxoplasmose, Lues und CMV getestet. Die Gewinnung der HSC erfolgt in den jeweiligen Zentren der Spender. Die beiden zur Verfügung stehenden Verfahren der Entnahme von KM oder PBSC erfolgen wie unter 1.2.3. beschrieben. Die Zellzahl, die benötigt wird, richtet sich nach dem Gewicht des Empfängers. Bei der Entnahme von Knochenmark können meist in einmaliger Sitzung die benötigten Zellen gesammelt werden, bei der Entnahme von PBSC muss, wenn die Zellzahl der ersten Leukapharese nicht ausreichend war, am darauffolgenden Tag noch einmal gesammelt werden. Das Knochenmark wird unmittelbar nach der Gewinnung gefiltert. Der im UK Eppendorf verwendete Filter wird von der Firma Baxter, Deerfield/USA hergestellt.

### 2.3.2. Transport

Das Präparat wird bei +4°C aufbewahrt und mit einem eigenen Kurier zum Transplantationszentrum des Empfängers gebracht. Ist es bei einer PBSC-Spende an zwei aufeinanderfolgenden Tagen zu ernten, so wird das Präparat des ersten Tages bei +4°C aufbewahrt und zusammen mit dem Präparat des zweiten Tages verschickt. Im Transplantationszentrum angekommen, sollte es nach Möglichkeit zeitnah (innerhalb von Stunden) dem Patienten gegeben werden. Ist dies aus medizinischen (überraschende Veränderung im Gesundheitszustand des Empfängers) oder logistischen (Spender konnte nur zu einem früheren Zeitpunkt spenden, etc.) Gründen nicht möglich, muss das Präparat eingefroren und in dieser Form aufbewahrt werden, bis der Empfänger transplantabel ist. Wie das Einfrieren erfolgt, ist unter 2.3.3. beschrieben. Die Frage nach der Entfernung von Spender- und Empfängerzentrum ist mit zu

berücksichtigen. Kommt das Spender-Präparat aus weiter entfernt liegenden Ländern, so kann der Transport gelegentlich länger dauern (toleriert wurde eine Zeitspanne bis zu 72 Stunden). Erfahrungswerte haben gezeigt, dass die Temperatur zwischen 4°C und 8°C liegen sollte, jedoch konnten Dyson et al. 2004 exemplarisch zeigen, dass dies leider nur bei 75% der Fälle zutrifft. Des Weiteren können auch Einflüsse wie konstante Erschütterung und Höhenstrahlung durch Flugtransport nicht ausgeschlossen werden.

### 2.3.3. Kryopreservation

Die Kryopreservation der Präparate und Proben der allogenen 'cryo' und autologen PBSC-Präparate erfolgte im Institut für Transfusionsmedizin, UK-Eppendorf Hamburg. Für die KM-Proben sowie die allogenen 'warmen' Proben, bei denen nur ein Pilotröhrchen eingefroren wurde, erfolgte die Kryopreservation in der Interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation. In letztgenannter Klinik erfolgt dies gemäß der Beschreibung von Stockschröder et al. (1995).

Im Einzelnen sind das folgende Schritte: nachdem die Zellen mit Ficoll-Paque separiert sind, werden die Stammzellen in Plasma suspendiert und Dimethylsulfoxid (DMSO, Cryo sure, WAK-Chemie, Steinbach, Deutschland) zugegeben, bis 10% der Gesamtkonzentration erreicht sind. Die Lösung wurde dann in spezielle Einfrierbeutel (Baxter, Cryocyte 4R 9957) gespritzt und in programmierbaren Gefrierschränken heruntergekühlt (Cryo 10-16 MR2, Messer-Griesheim, Sulzbach, Deutschland) dabei wurde anfangs  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  bis  $-6^{\circ}\text{C}$  gekühlt, dann  $-25^{\circ}\text{C}/\text{min}$  bis  $-50^{\circ}\text{C}$  erreicht sind, es erfolgt daraufhin eine Erwärmung um  $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$  bis wieder  $-18^{\circ}\text{C}$  erreicht sind, anschließend kühlt das Präparat weiter um  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  bis auf  $-45^{\circ}\text{C}$  ab und dann  $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , bis  $-90^{\circ}\text{C}$  erreicht sind. Die durchschnittliche Abkühlungsrate beträgt somit  $1,4\text{K}/\text{min}$ . Die so eingefrorenen Proben werden dann in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Der zwischenzeitige Anstieg der Temperatur während des Einfrierens rührt daher, dass in dem Moment, wo das Präparat relativ rasch den Gefrierpunkt unterschreitet, es kristallisiert und diese Kristallisationswärme das Präparat wieder auf  $-18^{\circ}\text{C}$  erwärmt.

Auf die gleiche Weise wurden die Pilotröhrchen der warm gegebenen allogenen PBSC-Präparate kryopreserviert. Das Vorgehen im Institut für Transfusionsmedizin für die allogenen und autologen PBSC-Präparate erfolgte wie Sputtek et al. 1997 und 2004 beschrieben haben. Zunächst wird den Präparaten gemäß der Empfehlung des Herstellers 15ml ACD-A (Anticoagulant Citrate Dextrose Solution Formula-A, Baxter, Deerfield, USA) als Antikoagulanzen beigemischt. Nach Zentrifugation zur gleichmäßigen Volumenverteilung werden die Präparate zu je 105 ml eingefroren, meistens in zwei Gefrierbeuteln. Auch hier wird DMSO bis zu einer Konzentration von 10% beigefügt. Die eigentliche Kryopreservation erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie oben für KM und die allogenen PBSC-Pilotröhrchen beschrieben. Die eingefrorenen Proben des Institut für Transfusionsmedizin wurden in der Dampfphase des flüssigen Stickstoffs bei  $-196^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **2.3.4. Auftauen und messen der Proben**

Alle Proben wurden unter gleichen Bedingungen und mit gleichen Methoden gemessen. Es wurden vier Proben maximal gleichzeitig gemessen. Die Proben wurden aus dem Stickstoff genommen und unter heißem fließendem Wasser bis zur ersten Bewegung des Präparates aufgetaut. Anschließend wurden sie umgehend in 15 ml Röhrchen mit 9 ml PBS (Phosphate-buffered-saline, GIBCO® invitrogen™, Paisley, UK) gegeben und sofort sieben Minuten bei 1600 Umdrehungen/Minute zentrifugiert, um das den Zellen schädliche DMSO möglichst rasch zu entfernen. Der Prozess vom Beginn des Auftauens bis zum Beginn der Zentrifugation dauerte nicht länger als eine Minute. Nach der Zentrifugation (Multifuge 3 s-r, Heraeus) wurde der Überstand verworfen und das Dekantat durch einen automatischen Rüttler (Certomat® MV, B. Braun Biotech International, Deutschland) gemischt, so dass ein gleichmäßiges hochkonzentriertes Zellsediment für die Weiterverarbeitung zur Verfügung stand. In einem 1 ml Röhrchen wurde eine Lösung aus 10% des Sediments und 90% des PBS-Puffers hergestellt. Die WBC (white blood cells) dieser Lösung wurden mit einem Zellzähler, Sysmex F-800 (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) gemessen. So konnte auf die Konzentration des

Pilotröhrchens und somit der Präparate während der Kryopreservation rückgeschlossen werden.

Für die Messungen wurde jeweils eine Lösung aus Zellsediment und 10% - iger Annexin V Puffer-Lösung (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) hergestellt mit einer Zellkonzentration zwischen  $5 - 20 \times 10^6$ /ml. Von dieser Zelllösung wurden jeweils 100  $\mu$ l in vier Reagenzgläser gegeben. In dem ersten waren zusätzlich jeweils 15  $\mu$ l konjugierte Antikörper CD34-PE (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland), CD45-FITC (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland), 7AA-D (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland), Annexin V-APC (BD Biosciences, New York, USA) In dem zweiten waren auch jeweils 15  $\mu$ l Antikörper CD45-FITC, IgG1-PE (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland), IgG1PC5 (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) und IgG1APC (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland). Nachdem nun die Antikörper mit der Zelllösung bei Raumtemperatur 10 Minuten im Dunkeln standen, wurden noch einmal je 2ml der 10%igen Annexin V Puffer- Lösung hinzugegeben. Daraufhin erfolgte eine siebenminütige Zentrifugation bei 1600 Umdrehungen/Minute. Anschließend wurde der Überstand verworfen und 2ml einer Lösung, bestehend aus PBS und 1% BSA (Albumin, bovine fraction V Solution, SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und 0,1% NaN<sub>3</sub> (Natrium Azide, SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), hinzugegeben. Dann erfolgte die Messung mit dem Durchflusszytometer.

Von der gleichen Zelllösung ( $5 - 20 \times 10^6$ /ml) wurde in ein Reagenzgläser 100  $\mu$ l gegeben zusätzlich zu 1ml Aldefluor<sup>®</sup> Buffer (Stem Cell Technologies, St. Katharinen, Deutschland). In dieses Reagenzglas wurden 15 $\mu$ l Aldefluor<sup>®</sup> gegeben und in ein zweites, leeres 15 $\mu$ l DEAB als negative Kontrolle. Direkt im Anschluss wurden 500 $\mu$ l der Aldefluor<sup>®</sup>-Zellsuspension in das zweite Reagenzglas zum DEAB gegeben. Nach kurzem texen wurden beide Reagenzgläser 30-60 Minuten in 37°C warmem Wasser i nkubiert. Anschließend wurden auch diese Proben mittels Durchflusszytometrie gemessen.

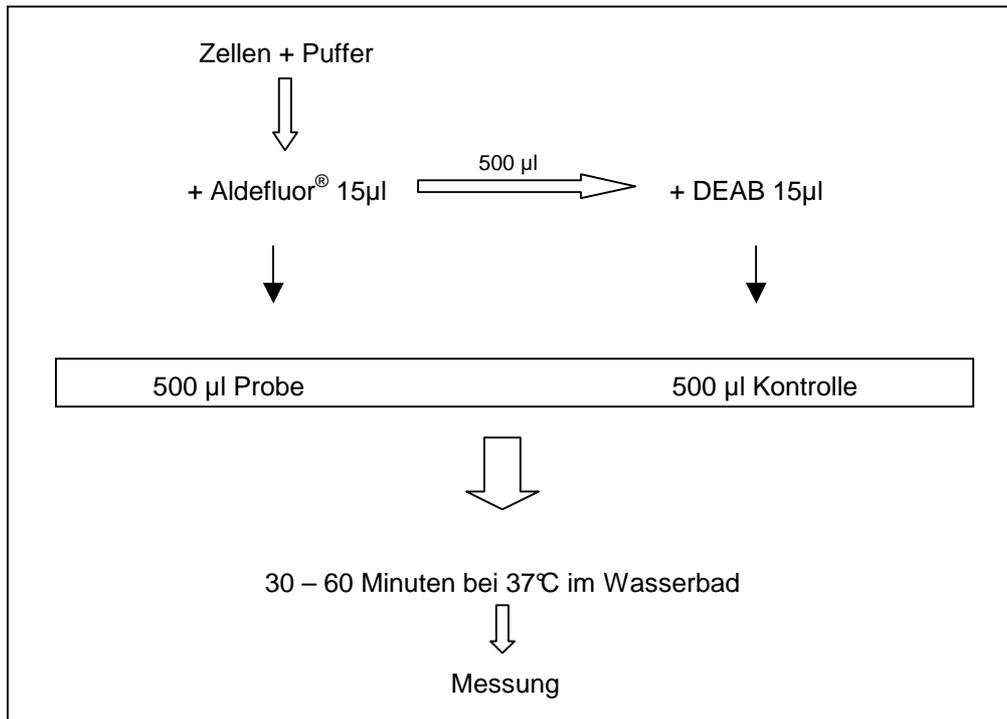


Abb. 3. Schema zur Herstellung der Probe für Aldefluor®

Vor der Messung der Proben am Durchflusszytometer erfolgte eine Kompensation. Das bedeutet, dass einmalig für jeden der Fluoreszenzfarbstoffe, die für die Proben zur Anwendung kamen, eine Messung erfolgte, in der die Signale des Farbstoffes, die schwach in den angrenzenden Kanälen leuchten rechnerisch herausgenommen wurden. So konnte sicher gestellt werden, dass die quantitativen Ergebnisse eines jeden Kanals tatsächlich nur für den Farbstoff leuchteten, der in diesem Kanal detektiert wurde.

Die Erfassung und Quantifizierung der CD34<sup>+</sup>-Zellen mittels Durchflusszytometrie erfolgte nach den ISHAGE-Richtlinien. Im ersten Fenster wurden mittels SSC und FSC die Subpopulationen Neutrophile, Monozyten und Lymphozyten detektiert.

Der nächste Schritt war die Selektion mittels FSC und CD45 FITC. Letzteres diente der Bestimmung der Leukozyten.

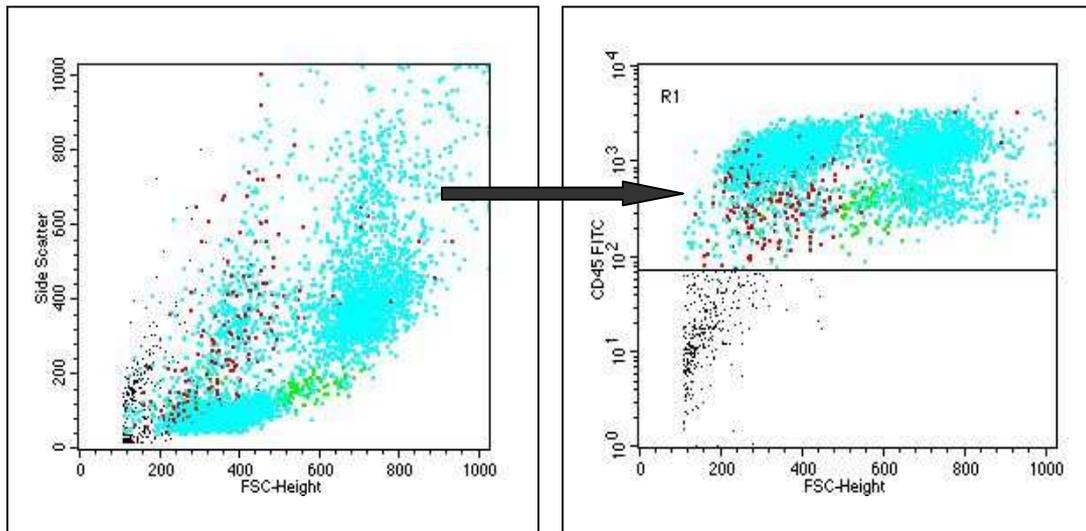


Abb. 4. Gating der Zellen mittels  $FSC^{hi}$ ,  $SSC^{lo}$  und  $CD45^+ > 100$ . Die Leukozyten sind türkis und die Stammzellen grün dargestellt.

Aus den Leukozyten wurde ein Gate gesetzt für die Zellen  $>100 CD45^+$ , das dann in einem neuen Fenster die Zellpopulation der Stammzellen mittels  $SSC^{lo}$  und  $CD34^+$  deutlich als Cluster erkennen ließ.

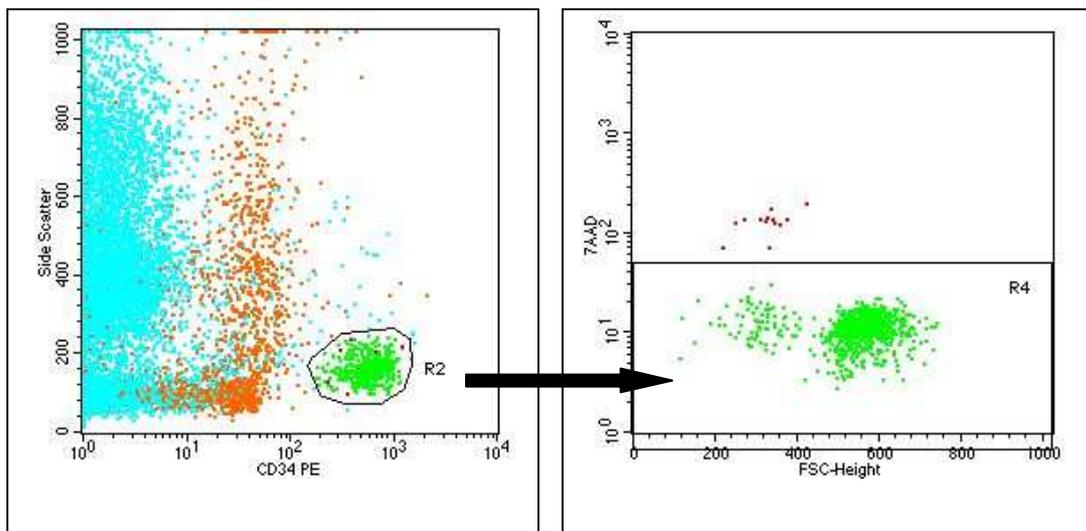


Abb. 5. Gating der Zellen mittels  $SSC^{lo}$ ,  $CD34^+$  und  $FSC^{hi}$  und 7-AAD. Leukozyten sind türkis, apoptotische Zellen rot und Stammzellen grün dargestellt.

Als weiteres Gate bestimmt, konnte in einem nächsten Fenster dieses Cluster auf seine Viabilität hin geprüft werden mittels 7-AAD und Annexin V, die die apoptotischen Zellen sichtbar machten.

Die zweite Probe, die mit Aldefluor<sup>®</sup> markiert wurde und ihre Negativkontrolle mit DEAB, wurden in je einem eigenen Fenster gemessen.

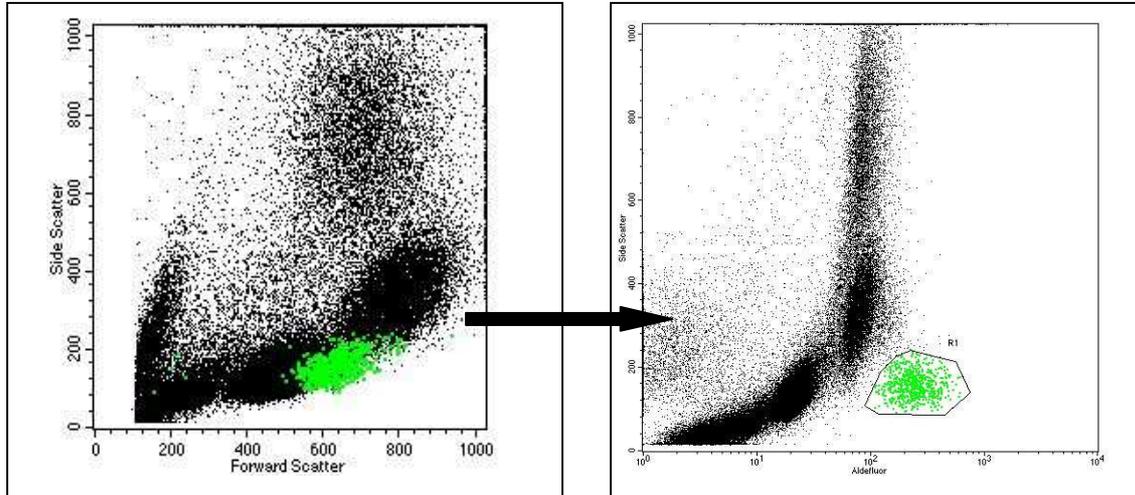


Abb. 6. Gating der Stammzellen mittels  $SSC^{lo}$ ,  $FSC^{hi}$  und  $SSC^{lo}$ ,  $ALDH^{br}$ . Die Stammzellen sind grün dargestellt.

Für die Aldefluor<sup>®</sup> Probe zeigte sich ein deutliches Cluster, das die  $SSC^{lo}ALDH^{br}$ -Zellen enthielt, die dann quantitativ bestimmt werden konnten. Die Negativkontrolle mittels Aldefluor<sup>®</sup> und DEAB beweiß dies, da dieses Cluster bei den Kontrollen nicht zu detektieren war.

### 2.3.5. CFU

Die CFU wurde, die autologen Proben ausgenommen, für die anderen Gruppen vor dem Einfrieren bestimmt. Für die allogenen PBSC-Proben, die parallel zu den Präparaten eingefroren wurden, erfolgte auch nach dem Auftauen eine CFU. Ebenso für die allogenen KM-Proben. Ein Zellvolumen mit  $1 \times 10^5$  Zellen wurde auf 1ml Methylcellulose gegeben, dem Wachstumsfaktoren beigelegt waren (Methocult<sup>®</sup>, Stem Cell Technologies, St. Katharinen, Germany). Nach 11-14 Tagen wurden die Kolonien bildenden Einheiten von Granulozyten und Makrophagen (CFU-GM) gezählt.

### 2.3.6. Klinische Daten

Die klinischen Daten wie Engraftment, Überleben der Patienten, Rezidiv und der Spender Chimärismus wurden den Patientendaten der Interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation des UK–Eppendorf entnommen. Ein Engraftment einer Zelllinie bedeutet, dass an zwei aufeinander folgenden Tagen der Schwellenwert der Zelllinie erreicht wird. Ist dies nicht bis zum Tag 30 nach Stammzelltransplantation erfolgt, bedeutet das per definitionem, dass ein Transplantatversagen, auch 'graft failure' genannt, eingetreten ist. In dieser Arbeit wurde das Engraftment der Leukozyten stellvertretend für alle drei Zelllinien (RBC, PLT, WBC) als klinischer Parameter hinzugezogen. Die Zellzahlen der Proben vor dem Einfrieren wurden Datensätzen des Instituts für Transfusionsmedizin/UK-Eppendorf entnommen.

### 2.4. Statistik

Für die Analyse der Tabellen und ihrer Ergebnisse wurde das Statistikprogramm WINSTAT3.1 verwendet. Zur Anwendung kamen der Student's t-Test, und der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman. Die Signifikanzgrenze für p lag bei  $p < 0,05$ .

### 3 Ergebnisse

In den folgenden Kapiteln sollen zuerst die Ergebnisse jeder einzelnen Gruppe für sich und anschließend ein Vergleich der Gruppen untereinander, anhand der einzelnen Parameter, dargestellt werden.

Die Kryopreservation der allogenen 'warmen' PBSC-Proben erfolgte nur für die Pilotröhrchen, nicht jedoch parallel für die Präparate weil sie 'warm' gegeben wurden. Deswegen ist fraglich, ob die Pilotröhrchen alle tatsächlich nach den Richtlinien wie unter 2.3.3. beschrieben, eingefroren wurden. Des Weiteren wurden diese Pilotröhrchen in der interdisziplinären Klinik für Stammzelltransplantation eingefroren im Gegensatz zu den anderen Gruppen, die alle parallel zu den Präparaten im Institut für Transfusionsmedizin eingefroren wurden und damit strikt nach den Richtlinien wie Sputtek et al. sie 1997 und 2004 beschrieben haben.

Aus diesen Gründen sollen, mit Ausnahme des nächsten Kapitels, im Folgenden die Ergebnisse der allogenen KM-Proben, der allogenen cryo PBSC-Proben und die autologen PBSC-Proben beschrieben werden.

Die Bedeutungen und Schlussfolgerungen der Ergebnisse wird in der Diskussion abschließend behandelt. Die Tabellen der vier Gruppen befinden sich im Anhang.

#### 3.1. Transportdauer und Temperatur

Diese Fragestellung wurde mit den Pilotröhrchen der allogenen 'warmen' PBSC-Proben bearbeitet. Der Mittelwert in Tagen betrug für die Proben mit langem Transportweg ( $n = 8$ ) 2 Tage ( $MV = 2 \pm 1,2$  Tage; range 0 - 4 ). Für die innereuropäischen Proben ( $n = 54$ ) ergab sich ein Mittelwert von 1,71 Tagen ( $MV = 1,71 \pm 0,58$  Tage; range 0 - 3). Das Ergebnis des unabhängigen t-Test's ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,2$ ). Die CD34<sup>+</sup>-Zellen, gemessen in Prozent der gesamten Leukozyten der Probe vor dem Einfrieren, zeigten in den Proben mit langem Transportweg signifikant niedrigere ( $p < 0,05$ ) CD34<sup>+</sup>-Zellen ('nah'  $MV = 0,89\%$  CD34<sup>+</sup>-Zellen der Leukozyten, range 1,92% - 0,29%; 'fern'  $MV = 0,58\%$  CD34<sup>+</sup>-Zellen der Leukozyten, range 1,11% - 0,23%). Dies

bestätigte den Verdacht, dass sich die Qualität der Präparate unter dem Transport verschlechterte.

Auch die CFU zeigte für die Proben mit langem Transportweg deutlich weniger Kolonien bildende Einheiten ( $MV = 19,32 \pm x 10^5/kg$ ) als die Proben aus näher gelegenen Zentren ( $MV = 31,16 \pm x 10^5/kg$ ). Auch wenn der Unterschied nicht signifikant war ( $p = 0,19$ ), so ist dennoch die Tendenz deutlich.

Die breite Verteilung der Werte sowohl innerhalb der Proben mit langer Transportzeit und -weg als auch der innereuropäischen Proben lässt jedoch vermuten, dass noch andere, bisher nicht identifizierte Faktoren, die Qualität mindern, denn die Reisezeit zeigte in den untersuchten Proben keinen signifikanten Unterschied. Dass der Unterschied nicht signifikant ist, kann auch daran liegen, dass die Anzahl der außereuropäischen Proben mit langem Transportweg so klein ist. Dies bedeutet, dass durchaus die Zeit die entscheidende Rolle spielen kann, dies aber mit der kleinen Stichprobe nicht bewiesen werden konnte.

Die Frage nach Temperaturschwankungen lässt sich nicht direkt beantworten, da die Proben ohne eine kontinuierliche Messung geschickt wurden. Empfohlen wird ein Temperaturbereich zwischen  $+4^\circ\text{C}$  und  $+8^\circ\text{C}$ . Wie unter 2.3.2. beschrieben, weicht die tatsächliche Temperatur vermutlich häufig davon ab, dies wird jedoch nicht kontinuierlich überprüft.

## **3.2. Ergebnisse der allogenen KM-, allogenen cryo PBSC- und autologen PBSC-Proben**

In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse der einzelnen Gruppen mittels Statistik und Abbildungen dargestellt werden.

### **3.2.1. allogene KM-Proben**

Vor dem Einfrieren wurden bei den allogenen KM-Proben ( $n = 13$ ) die Zellkonzentrationen der Erythrozyten (RBC), Thrombozyten (PLT) und Leukozyten (WBC) gemessen. Die Messungen erfolgten nach Zellseparierung durch Ficoll-Paque. Die RBC zeigten eine mittlere Konzentration von  $MV = 0,02 \pm 0,01 \times 10^9/ml$ , die PLT eine mittlere Konzentration von  $MV = 47 \pm 6,2 \times 10^6/ml$  und die WBC eine mittlere Konzentration von  $MV = 99 \pm 38,9 \times 10^6/ml$ .

Die CD34<sup>+</sup>-Zellen, gemessen in Prozent der gesamten Leukozyten der Probe vor dem Einfrieren, zeigten einen Mittelwert von 1,7% ± 0,4%.

Nach dem Einfrieren und wieder Auftauen zeigten die CD34<sup>+</sup>-Zellen in Prozent der gesamten Leukozyten der Probe einen Mittelwert von 2,1% ± 0,5%, CI = 0,3. Die CD34<sup>+</sup>-Zellen nach dem Einfrieren und wieder Auftauen waren signifikant ( $p < 0,05$ ) mehr als die CD34<sup>+</sup>-Zellen vor dem Einfrieren. Auf dieses überraschende Ergebnis soll in der Diskussion noch näher eingegangen werden.

Um nun die Viabilität dieser CD34<sup>+</sup>-Zellen in Prozent der Leukozyten nach dem Einfrieren und wieder Auftauen (2,1%) zu überprüfen, wurde getestet, wie viele dieser CD34<sup>+</sup>-Zellen auch 7-AAD<sup>-</sup> waren. Dies ergab 89 % CD34<sup>+</sup>-7-AAD<sup>-</sup>-Zellen der gesamten CD34<sup>+</sup>-Zellen. Das heißt umgerechnet auf CD34<sup>+</sup>-7-AAD<sup>-</sup>-Zellen in Prozent von den gesamten Leukozyten der Probe waren tatsächlich lebendige CD34<sup>+</sup>-Zellen im Mittel 1,9% und nicht 2,1%.

Die ALDH<sup>br</sup>-Zellen in Prozent der gesamten Leukozyten ergaben nach dem Einfrieren und wieder Auftauen einen Mittelwert von 2,1% ± 0,5%.

Dieser Unterschied der tatsächlich lebendigen CD34<sup>+</sup>-Zellen (1,9%) und der ALDH<sup>br</sup>-Zellen (2,1%) ist zu gering, um Schlussfolgerungen daraus zu ziehen.

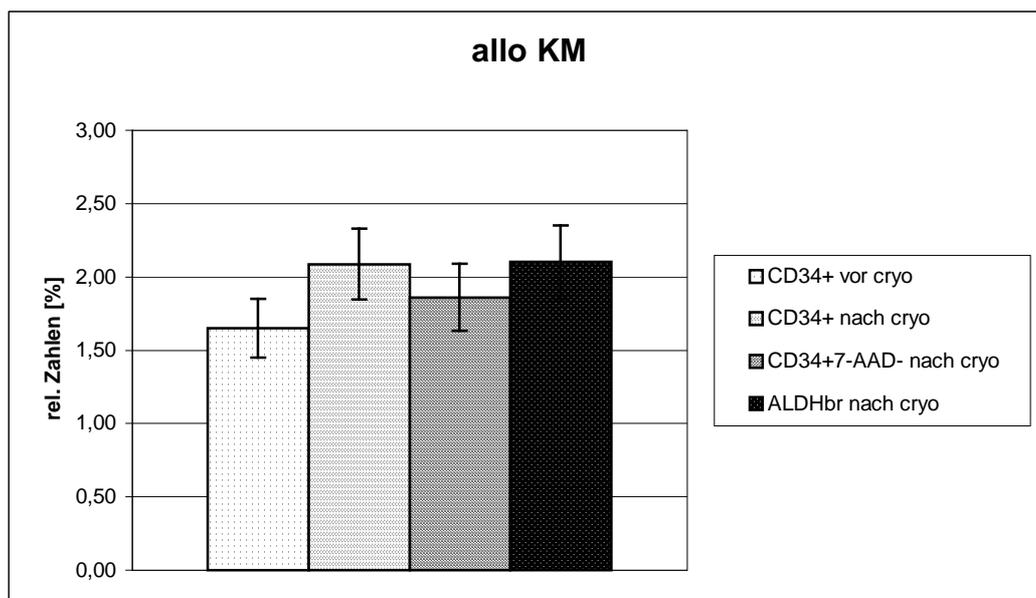


Abb. 7. Relative Zellzahlen in Prozent der Leukozyten von CD34<sup>+</sup> vor und nach cryo, CD34<sup>+</sup>-7-AAD<sup>-</sup> und ALDH<sup>br</sup> nach cryo der allogenen KM-Proben

Die Abbildung zeigt deutlich, dass die Ergebnisse insgesamt, aber besonders die Ergebnisse nach dem Einfrieren und wieder Auftauen, keine großen Unterschiede aufweisen. Das Verhältnis der ALDH<sup>br</sup>-Zellen zu den CD34<sup>+</sup>-Zellen (ALDH<sup>br</sup>/CD34<sup>+</sup> Ratio) gemessen nach dem Einfrieren und wieder Auftauen, betrug im Mittel  $1 \pm 0,1$ , CI = 0,02 mit einem range von 0,96 – 1,13. Die CFU x 10<sup>5</sup>/kg KG des Empfängers zeigte keinen signifikanten Unterschied vor dem Einfrieren und nach dem Einfrieren und wieder Auftauen ('vor' MV =  $5,5 \times 10^5/\text{kg} \pm 4,3 \times 10^5/\text{kg}$  respektive 'nach' MV =  $6,5 \times 10^5/\text{kg} \pm 4,8 \times 10^5/\text{kg}$ ).

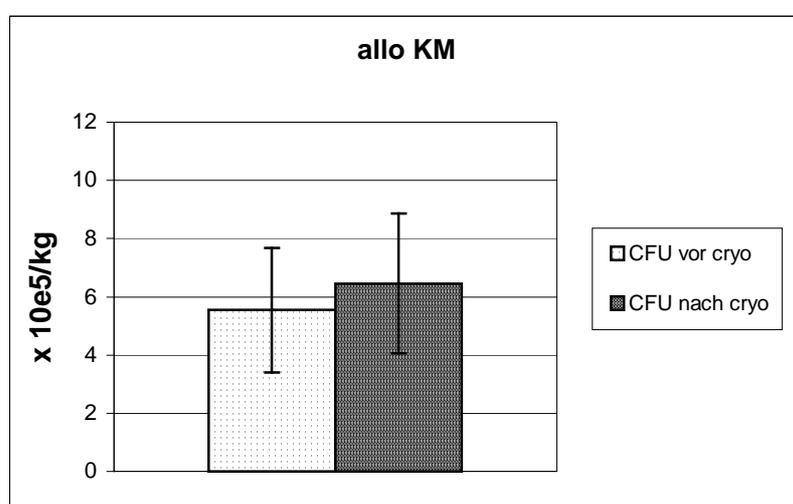


Abb. 8. Ergebnisse von CFU x10<sup>5</sup>/kg KG vor und nach cryo der allogenen KM-Proben

Insgesamt ist deutlich, dass das Knochenmark, wie die betrachteten Merkmale klar zeigten, keinen Schaden durch das Einfrieren genommen hat. Dies wurde bestätigt durch ein Engraftment der Leukozyten,  $L > 1000/\mu\text{l}$  in Tagen (MV = 17,1 Tage  $\pm 2,8$  Tage, mit einem range von 12 - 22 Tagen) aller Empfänger und dem vollen Spender Chimärismus von 9 der 13 Patienten. Die Daten des Spender Chimärismus der restlichen vier Patienten waren zum Zeitpunkt der Erhebung nicht verfügbar.

### 3.2.2. allogene cryo PBSC-Proben

Vor dem Einfrieren wurden bei den allogenen cryo PBSC-Proben (n = 32) die Zellkonzentrationen der Erythrozyten (RBC), Thrombozyten (PLT) und Leukozyten (WBC) gemessen.

Die RBC zeigten eine mittlere Konzentration von  $MV = 0,6 \pm 0,2 \times 10^9/\text{ml}$ , die PLT eine mittlere Konzentration von  $MV = 2282 \pm 786 \times 10^6/\text{ml}$  und die WBC eine mittlere Konzentration von  $MV = 213 \pm 92,1 \times 10^6/\text{ml}$ .

Die  $CD34^+$ -Zellen, gemessen in Prozent der gesamten Leukozyten der Probe vor dem Einfrieren, zeigten einen Mittelwert von  $0,9\% \pm 0,5\%$ .

Nach dem Einfrieren und wieder Auftauen zeigten die  $CD34^+$ -Zellen in Prozent der gesamten Leukozyten der Probe einen Mittelwert von  $0,58\% \pm 0,2\%$ . Die  $CD34^+$ -Zellen nach dem Einfrieren und wieder Auftauen waren hoch signifikant ( $p < 0,05$ ) vermindert.

Um nun die Viabilität dieser  $CD34^+$ -Zellen nach dem Einfrieren und wieder Auftauen zu überprüfen, wurde getestet, wie viele dieser  $CD34^+$ -Zellen auch  $7\text{-AAD}^-$  waren. Dies ergab 77%  $CD34^+7\text{-AAD}^-$ -Zellen der gesamten  $CD34^+$ -Zellen. Das heißt umgerechnet auf  $CD34^+7\text{-AAD}^-$ -Zellen in Prozent von den gesamten Leukozyten der Probe waren tatsächlich lebendige  $CD34^+$ -Zellen im Mittel 0,45% und nicht 0,58%. Dies waren hoch signifikant weniger tatsächlich lebendige ( $7\text{-AAD}^-$ )  $CD34^+$ -Zellen als nur mit der alleinigen Messung der  $CD34^+$ -Zellen detektiert wurden. Noch deutlicher war der Verlust nach dem Einfrieren und wieder Auftauen sichtbar durch die Messung der funktionellen Stammzellfähigkeit mittels Aldefluor<sup>®</sup>. Die  $ALDH^{\text{br}}$ -Zellen in Prozent der gesamten Leukozyten ergaben nach dem Einfrieren und wieder Auftauen einen Mittelwert von  $0,43\% \pm 0,3\%$ .

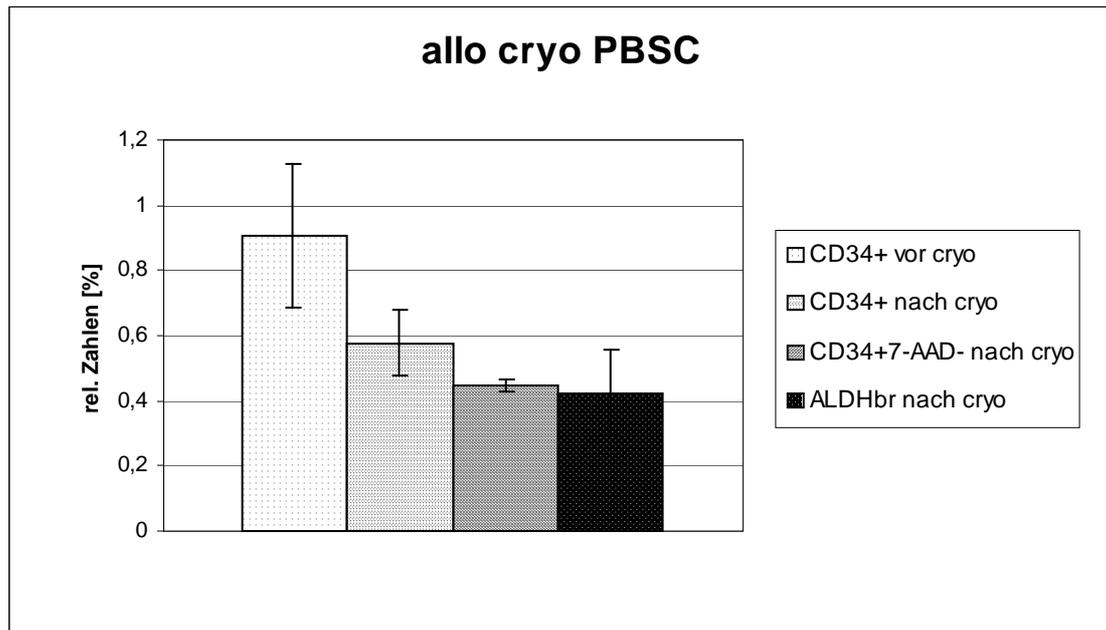


Abb. 9. Relative Zellzahlen in Prozent von CD34<sup>+</sup> vor und nach cryo, CD34<sup>+</sup>7-AAD<sup>-</sup> und ALDH<sup>br</sup> nach cryo der allogenen cryo PBSC-Proben

Auch hier war das Verhältnis der ALDH<sup>br</sup>-Zellen zu den CD34<sup>+</sup>-Zellen (ALDH<sup>br</sup>/CD34<sup>+</sup> Ratio) gemessen nach dem Einfrieren und wieder Auftauen als Vergleich hinzugezogen worden mit einem Mittelwert von  $0,7 \pm 0,1$  (range 0,26 – 1). Diese Diskrepanz zwischen den Messungen allein mit CD34 als Oberflächenmarker, oder aber mit der ALDH machte deutlich, wie viele der Zellen ihre funktionelle Stammzellfähigkeit bereits verloren hatten (ALDH<sup>lo</sup>), aber trotzdem noch mittels Oberflächenmarker (CD34<sup>+</sup>) als Stammzellen detektiert wurden.

Die deutliche Verschlechterung der Proben nach dem Einfrieren und wieder Auftauen, spiegelte sich in gleichem Maße wie bei der ALDH<sup>br</sup>/CD34<sup>+</sup> Ratio auch bei den Ergebnissen der CFU x 10<sup>5</sup>/kg Körpergewicht des Empfängers wider. Ein hoch signifikanter Verlust der CFU nach dem Einfrieren und wieder Auftauen konnte gezeigt werden ('vor' MV =  $45,3 \times 10^5$ /kg, respektive 'nach' MV =  $7,8 \times 10^5$ /kg).

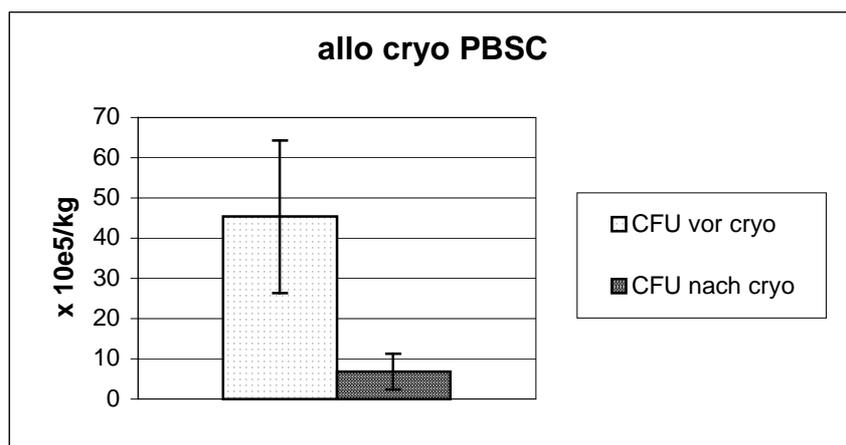


Abb. 10. Ergebnisse von CFU x10<sup>5</sup>/kg KG vor und nach cryo der allogenen cryo PBSC-Proben

Insgesamt ist deutlich, dass die Qualität der allogenen cryo PBSC-Proben nach dem Einfrieren und wieder Auftauen eindeutig gemindert war. Dies wurde bestätigt durch ein gemischteres Bild des Engraftment der Leukozyten,  $L > 1000/\mu\text{l}$  in Tagen (MV =  $16,1 \pm 3,4$  Tage, mit einem range von 11 - 25 Tagen). Bei fünf Patienten (16%) trat ein 'graft failure' ein und drei Patienten (9%) hatten kein Engraftment, da sie vor dem Tag 30 nach Transplantation verstorben sind. Auch der Spender Chimärismus zeigte ein breites Spektrum von vollem Spender Chimärismus bis gar keiner. Bei 18 (56%) der 32 Patienten konnte ein voller Spender Chimärismus (range Tag18 - Tag152) bestimmt werden, bei acht Patienten (25%) konnte kein Spender Chimärismus nachgewiesen werden, fünf (16%) Patienten erreichten nur einen gemischten Spender Chimärismus und bei einem Patient (3%) konnten die Daten nicht erhoben werden.

Bei 18 (56%) der 32 Patienten trat ein Rezidiv auf und 16 (50%) der 32 Patienten sind verstorben.

### 3.2.3. allogene cryo PBSC-Proben Gruppe I und II

Die breite Verteilung (0,26 – 1) der  $\text{ALDH}^{\text{br}}/\text{CD34}^+$  Ratio in der Gruppe der allogenen cryo PBSC-Proben, führte zu der Überlegung, dass nicht alle Proben gleich viel ihrer Qualität durch das Einfrieren und wieder Auftauen einbüßen. Eine sinnvolle Teilung schien, sie nach ihrer  $\text{ALDH}^{\text{br}}/\text{CD34}^+$  Ratio zu teilen. Dies

fürte zu einer Gruppe (Gruppe I, n = 23) mit einem relativ hohen Wert  $\text{ALDH}^{\text{br}}/\text{CD34}^+$  Ratio  $> 0,5$  (MV =  $0,87 \pm 0,1$ ; range 0,63 – 1) und einer zweiten Gruppe (Gruppe II, n = 9) mit niedriger ( $\leq 0,5$ )  $\text{ALDH}^{\text{br}}/\text{CD34}^+$  Ratio. Der Mittelwert der Gruppe II lag bei einer  $\text{ALDH}^{\text{br}}/\text{CD34}^+$  Ratio von  $0,32 \pm 0,1$  und wies ein range von 0,26 – 0,5 auf. Der Mittelwert der  $\text{ALDH}^{\text{br}}/\text{CD34}^+$  Ratio in Gruppe II war hoch signifikant ( $p < 0,005$ ) niedriger als in Gruppe I.

Vor dem Einfrieren zeigten die beiden Gruppen in keinem untersuchten Parameter (Zellkonzentrationen der WBC, PLT, RBC sowie der  $\text{CD34}^+$ -Zellen in Prozent von den gesamten Leukozyten) signifikante Unterschiede. Auch die  $\text{CD34}^+$ -Zellen nach dem Einfrieren und wieder Auftauen ohne und mit Überprüfung der Viabilität mittels 7-AAD zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Jedoch der Vergleich der  $\text{ALDH}^{\text{br}}$ -Zellen beider Gruppen zeigte hoch signifikant ( $p < 0,005$ ) weniger  $\text{ALDH}^{\text{br}}$ -Zellen  $\times 10^6/\text{kg}$  Körpergewicht des Empfängers in Gruppe II als in Gruppe I (Gruppe II MV =  $2 \pm 0,75 \times 10^6/\text{kg}$  vs. Gruppe I MV =  $5,2 \pm 2,5 \times 10^6/\text{kg}$ ).

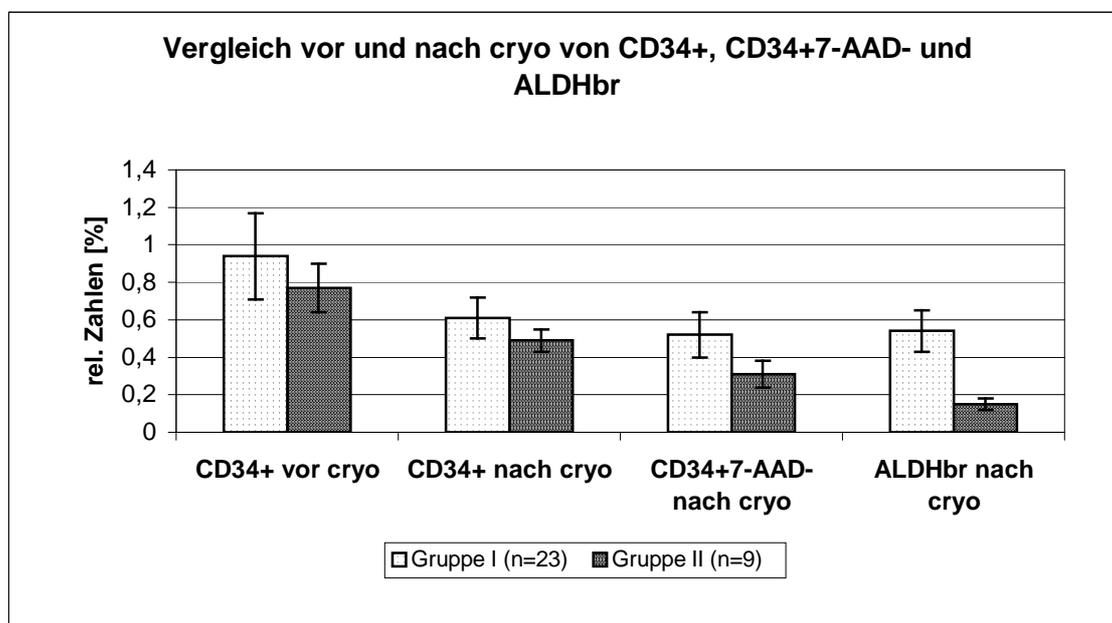


Abb. 11. Vergleich von  $\text{CD34}^+$ ,  $\text{CD34}^+7\text{-AAD}^-$  und  $\text{ALDH}^{\text{br}}$  in Prozent von den gesamten Leukozyten der Gruppen I und II. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Werte die im Text mit pro kg angegeben wurden umgerechnet in Prozent der Leukozyten.

Diese Verminderung der ALDH<sup>br</sup>-Zellen zeigte eine deutliche Korrelation ( $r^2 = 0,63$ ;  $p < 0,05$ ) mit der CFU  $\times 10^5/\text{kg}$  beider Gruppen (Gruppe I MV =  $8,73 \times 10^5/\text{kg}$  vs. Gruppe II MV =  $1,76 \times 10^5/\text{kg}$ ).

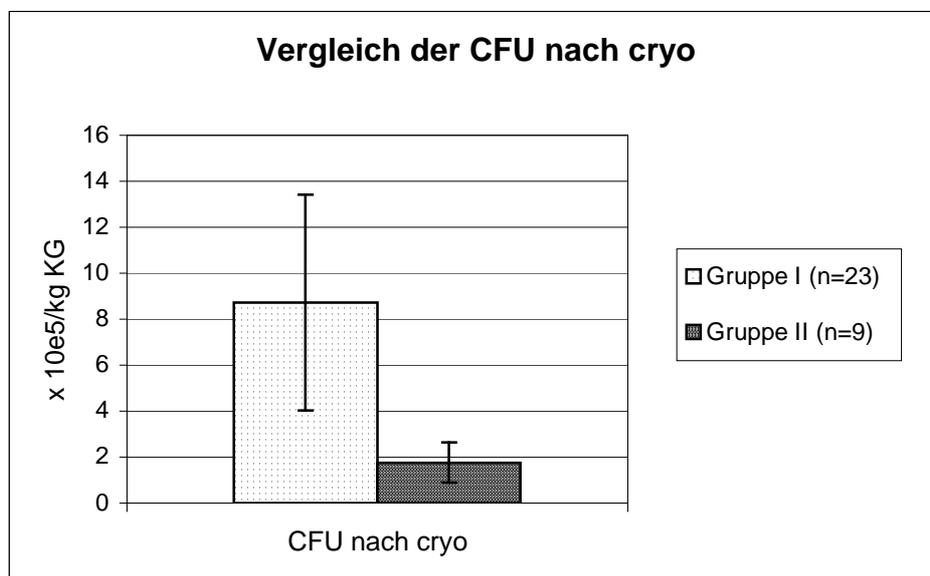


Abb. 12. Vergleich der CFU  $\times 10^5/\text{kg}$  KG nach cryo der Gruppen I und II

Passend zu den schlechten Ergebnissen der ALDH<sup>br</sup>-Zellen und der CFU in Gruppe II zeigten sieben der neun Patienten kein Engraftment und zwei der Patienten mit Engraftment entwickelten nur einen gemischten Spender Chimärismus, erkrankten an einem frühen Rezidiv und sind verstorben.

In Gruppe I hatten dagegen 96%, 22 der 23 Patienten, ein Engraftment der Leukozyten ( $L > 1000/\mu\text{l}$  an Tag  $15,9 \pm 3,3$ ) und 18 zeigten einen vollen Spender Chimärismus.

### 3.2.4. autologe PBSC-Proben

Vor dem Einfrieren wurden bei den autologen PBSC-Proben ( $n = 19$ ) die Zellkonzentrationen der Erythrozyten (RBC), Thrombozyten (PLT) und Leukozyten (WBC) gemessen. Die RBC zeigten eine mittlere Konzentration von  $MV = 0,4 \pm 0,2 \times 10^9/\text{ml}$ , die PLT eine mittlere Konzentration von  $MV = 1327 \pm 771 \times 10^6/\text{ml}$  und die WBC eine mittlere Konzentration von  $MV = 190 \pm 90 \times 10^6/\text{ml}$ .

Die CD34<sup>+</sup>-Zellen, gemessen in Prozent der gesamten Leukozyten der Probe vor dem Einfrieren, zeigten einen Mittelwert von  $1,6\% \pm 1,5\%$ .

Nach dem Einfrieren und wieder Auftauen zeigten die CD34<sup>+</sup>-Zellen in Prozent der gesamten Leukozyten der Probe einen Mittelwert von 1,4% ± 1,6.

Um nun die Viabilität dieser CD34<sup>+</sup>-Zellen in Prozent der Leukozyten nach dem Einfrieren und wieder Auftauen zu überprüfen, wurde getestet, wie viele dieser CD34<sup>+</sup>-Zellen auch 7-AAD<sup>-</sup> waren. Dies ergab 86% CD34<sup>+</sup>7-AAD<sup>-</sup>-Zellen der gesamten CD34<sup>+</sup>-Zellen. Das heißt umgerechnet auf CD34<sup>+</sup>7-AAD<sup>-</sup>-Zellen in Prozent von den gesamten Leukozyten der Probe waren tatsächlich lebendige CD34<sup>+</sup>-Zellen im Mittel 1,2% und nicht 1,4%. Dies war ein nur geringer Verlust an CD34<sup>+</sup>-Zellen.

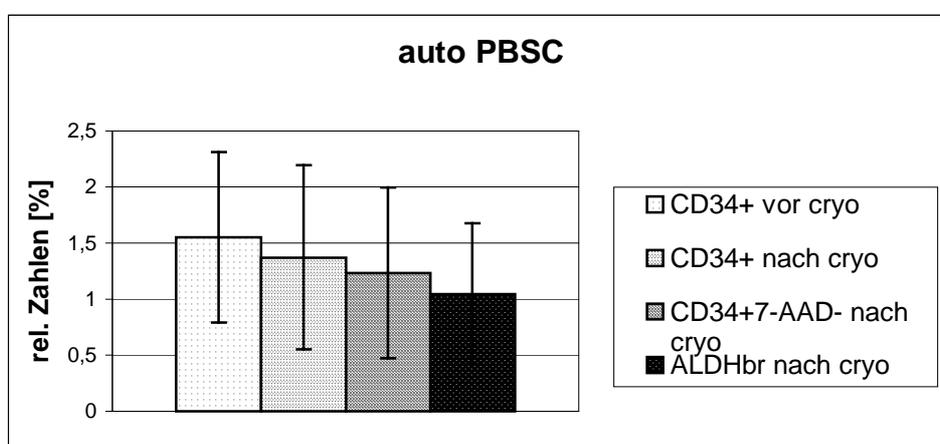


Abb. 13. Relative Zellzahlen in Prozent der Leukozyten von CD34<sup>+</sup> vor und nach cryo, CD34<sup>+</sup>7-AAD<sup>-</sup> und ALDH<sup>br</sup> nach cryo der autologen PBSC-Proben

Die ALDH<sup>br</sup>-Zellen in Prozent der gesamten Leukozyten ergaben nach dem Einfrieren und wieder Auftauen einen Mittelwert von 1,1% ± 1,3%. Auch dieses Ergebnis zeigt nur einen geringfügigen Unterschied der gemessenen Zellen nach dem Einfrieren und wieder Auftauen im Vergleich zu den CD34<sup>+</sup>7-AAD<sup>-</sup>-Zellen.

Das Verhältnis der ALDH<sup>br</sup>-Zellen in Prozent von der Gesamtzellzahl zu den CD34<sup>+</sup>-Zellen auch in Prozent von der Gesamtzellzahl, ALDH<sup>br</sup>/CD34<sup>+</sup> Ratio, betrug im Mittel 0,78 ± 0,1 mit einem range von 0,61 – 1,03.

Alle Patienten zeigten ein zeitnahes Engraftment der Leukozyten L>1000/μl mit einem Mittelwert von 11,5 ± 0,8 Tagen und keiner der Patienten erlitt ein graft failure.

Zusammenfassend lässt dich sagen, dass die autologen PBSC-Proben trotz des Einfrierens und wieder Auftauens relativ stabil geblieben sind und sich dies auch durch schnelles Engraftment bestätigt hat.

### 3.3. Vergleich der Proben von allogenen cryo PBSC, allogenen KM und autologen PBSC

In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse der einzelnen Gruppen miteinander verglichen werden, um die entscheidenden Erkenntnisse und signifikanten Unterschiede, besonders zwischen den allogenen KM-Proben und den allogenen cryo PBSC-Proben zu verdeutlichen.

#### 3.3.1. Zellkonzentrationen der RBC, PLT und WBC

Wie deutlich auf der Abbildung zu sehen ist, unterschieden sich die Zellkonzentrationen der drei Gruppen signifikant voneinander.

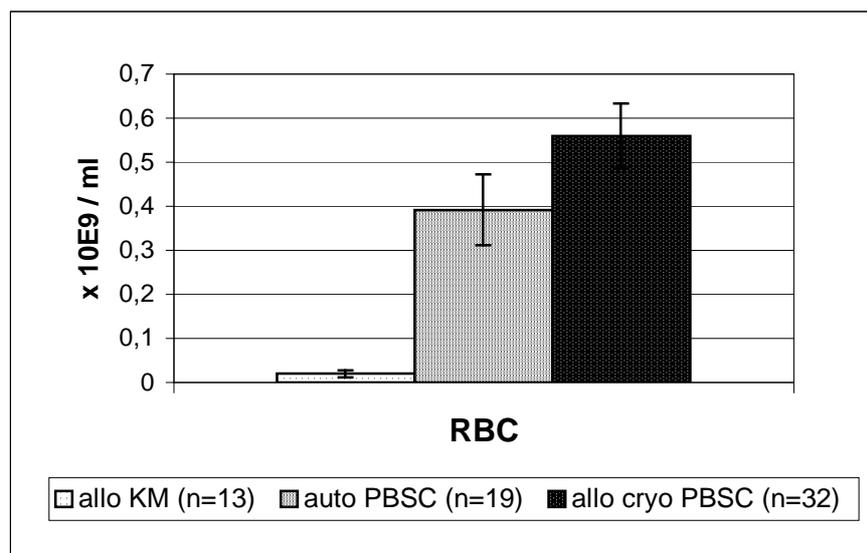


Abb. 14. Erythrozytenkonzentration der drei Gruppen vor cryo

Der Vergleich der Thrombozytenkonzentration in den drei Gruppen zeigte auch ein ähnliches Konzentrationsgefälle wie die Erythrozytenkonzentration.

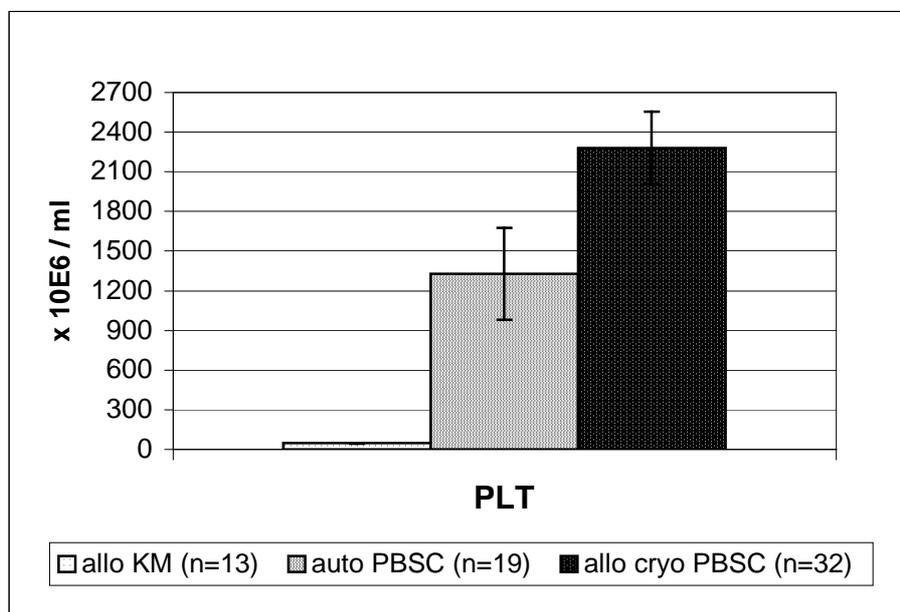


Abb. 15. Thrombozytenkonzentration der drei Gruppen vor cryo

Auch wenn der Unterschied der Zellkonzentration zwischen den autologen PBSC-Präparaten und den allogenen cryo PBSC-Proben ( $MV = 2282 \times 10^6/\text{ml}$ ) nicht statistisch signifikant ( $p > 0,05$ ) ist, so ist jedoch deutlich die Tendenz sichtbar. Die Thrombozytenkonzentration der allogenen cryo PBSC-Proben dagegen war hoch signifikant ( $p < 0,005$ ) höher als die der allogenen KM-Proben.

Nicht zuletzt der Vergleich der Leukozytenkonzentrationen in den drei Gruppen zeigte signifikant ( $p < 0,05$ ) unterschiedliche Ergebnisse zwischen allen drei Gruppen.

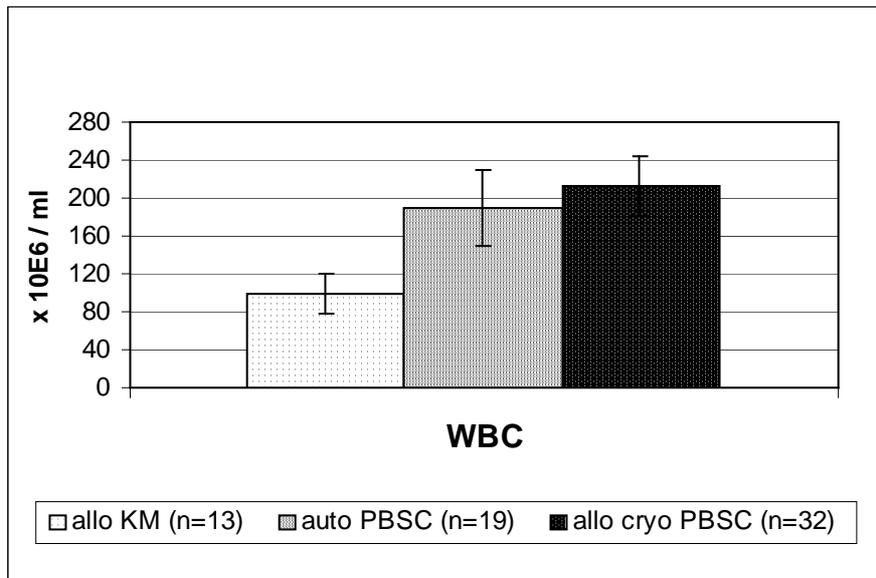


Abb. 16. Leukozytenkonzentrationen der drei Gruppen vor cryo

Welche Auswirkung die hohen Zellkonzentrationen direkt auf die Präparate haben, konnte nicht detektiert werden, jedoch bleibt zu diskutieren, ob dies einer der verantwortlichen Faktoren für die schlechteren Ergebnisse der allogenen cryo PBSC-Proben ist.

### 3.3.2. CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>7-AAD<sup>-</sup> und ALDH<sup>br</sup>

Wie schon bei der Darlegung der einzelnen Gruppen deutlich wurde, waren die Ergebnisse dieser Parameter sehr unterschiedlich.

Von besonderem Interesse sind die Unterschiede zwischen den allogenen KM-Proben und den allogenen cryo PBSC-Proben.

Bei allen Ergebnissen zeigten die allogenen cryo PBSC-Proben hoch signifikant niedrigere Ergebnisse als die allogenen KM-Proben. Zu berücksichtigen gilt es, dass die Gruppe der allogenen cryo PBSC-Proben eine große Verteilung der Werte aufweist und nicht zuletzt deswegen wie unter 3.2.3. beschrieben in zwei Gruppen aufgeteilt wurde.

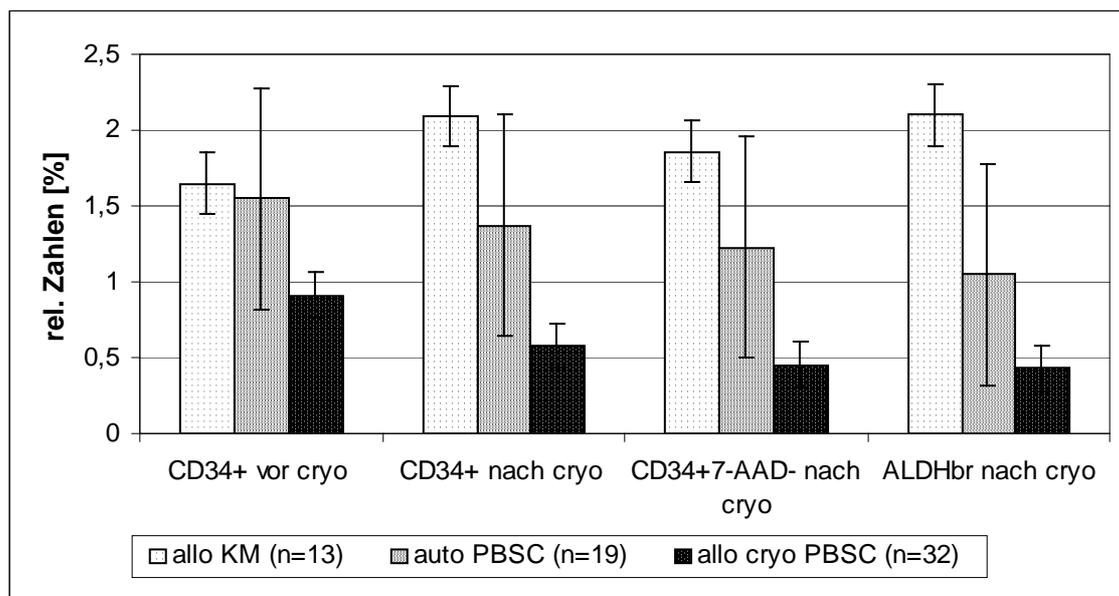


Abb. 17. Relative Zellzahlen in Prozent von CD34<sup>+</sup> vor und nach cryo, CD34<sup>+</sup>7-AAD<sup>-</sup> und ALDH<sup>br</sup> nach cryo im Vergleich der allogenen KM-Proben, autologen PBSC-Proben und der allogenen cryo PBSC-Proben

Die deutlich schlechtere Beurteilung, die mittels Oberflächenmarker wie CD34 möglich ist, spielt besonders für die Beurteilung der Präparate nach einer Kryopreservation eine entscheidende Rolle. Um einen besseren Vergleich zu haben für die Werte vor und nach cryo, wurde sowohl für die allogenen KM-Proben als auch für die allogenen cryo PBSC-Proben jeweils eine Vergleichsgruppe frisch gemessener Proben herangezogen, da die Daten vor dem Einfrieren für die in dieser Arbeit untersuchten Präparate retrospektiv nicht erhoben werden konnten. Die allogene KM-Kontrollgruppe umfasst 14 Proben und die der allogenen PBSC-Gruppe 32. Es ist aber davon auszugehen, dass die gewählten Kontrollproben sich nicht von den Proben dieser Arbeit signifikant unterscheiden, da vor dem Einfrieren sowohl bei den allogenen KM-Proben als auch bei den allogenen cryo PBSC-Proben keine Auffälligkeiten in Bezug auf die Qualität der Stammzellen vorlagen.

Verglichen wurde die Membranintegrität mittels CD34<sup>+</sup>7-AAD<sup>-</sup>-Zellen in Prozent der Leukozyten der jeweiligen allogenen KM-Proben und allogenen PBSC-Proben vor und nach dem Einfrieren.

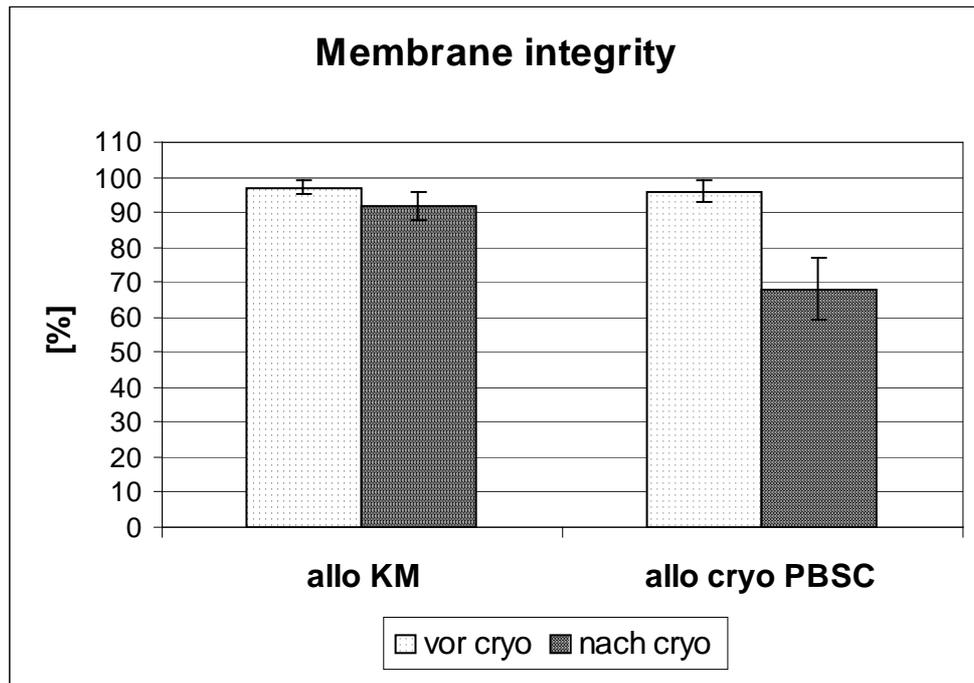


Abb. 18. Ergebnisse der Membranintegrität, gemessen mittels 7-AAD vor und nach cryo im Vergleich der allogenen KM-Proben und der allogenen cryo PBSC-Proben mit frisch gemessenen Referenzproben

Die allogenen KM-Proben zeigten keinen signifikanten Verlust der Membranintegrität vor und nach dem Auftauen (vor  $89\% \pm 3,2\%$ ; range 87% - 93% und nach  $97\% \pm 2,6\%$ ; range 92% - 100%). Die allogenen PBSC-Proben hingegen zeigten einen signifikanten ( $p < 0,05$ ) Verlust der Membranintegrität nach dem Einfrieren und wieder Auftauen (vor  $96\% \pm 5,6\%$ , range 91% - 100% und nach  $69\% \pm 9,4\%$ , range 19% - 99%).

Auch die ALDH<sup>br</sup>/CD34<sup>+</sup> Ratio war signifikant vermindert in den allogenen PBSC-Proben nach dem Einfrieren und wieder Auftauen (vor  $0,93 \pm 0,17$  und nach  $0,71 \pm 0,27$ ) im Vergleich zu den frisch gemessenen Proben. Die allogenen KM-Proben zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied.

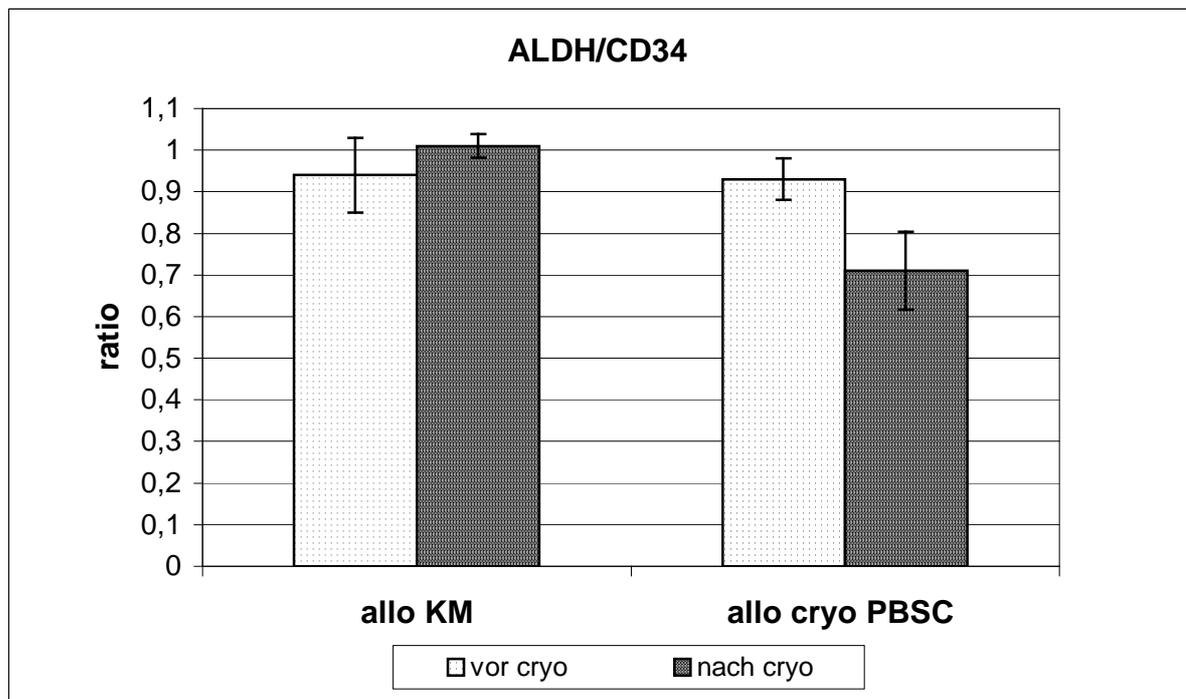


Abb. 19. Ergebnisse der ALDH<sup>br</sup>/CD34<sup>+</sup> Ratio vor und nach cryo im Vergleich der allogenen KM-Proben und der allogenen cryo PBSC-Proben mit frisch gemessenen Kontrollproben

### 3.3.3. CFU

Die Ergebnisse der CFU zeigten den deutlichen Verlust der allogenen cryo PBSC-Proben vor und nach cryo im Vergleich zu den allogenen KM-Proben.

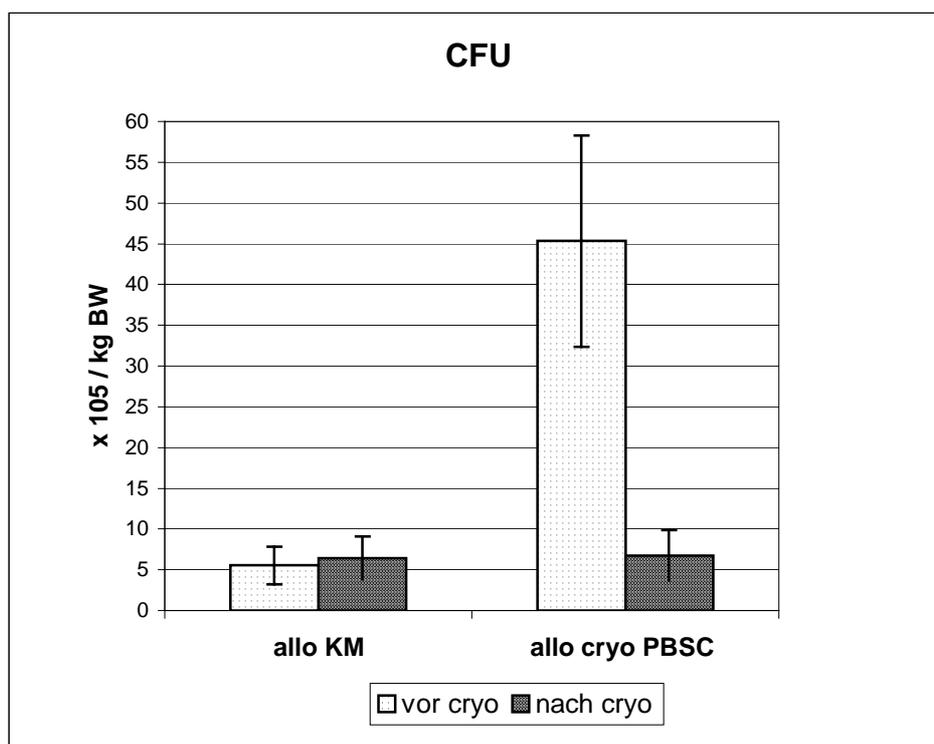


Abb. 20. Ergebnisse von CFU x10<sup>5</sup>/kg KG vor und nach cryo im Vergleich der allogenen KM-Proben und der allogenen cryo PBSC-Proben

Auch wenn die allogenen cryo PBSC-Präparate nach dem Einfrieren und wieder Auftauen ähnliche Ergebnisse wie die allogenen KM-Proben zeigten, so bleibt trotzdem die Diskrepanz des schlechteren Engraftment und Spender Chimärismus bei den allogenen cryo PBSC-Präparaten bestehen. Offensichtlich scheint trotz gleicher Quantität der CFU ein qualitativer Unterschied im gesamten Präparat zu bestehen, der durch die Messung der CFU nicht detektiert werden kann, jedoch Auswirkungen für die Qualität zeigt.

## 4 Diskussion

### 4.1. Eigene Ergebnisse

Um nun die vielfältigen und in verschiedene Richtungen gehenden Ergebnisse zu deuten, zu diskutieren und miteinander in Beziehung zu setzen, sollen auch hier in einzelnen Abschnitten die verschiedenen Themen bearbeitet werden.

#### 4.1.1. Transport und Lagerung

Die Eingangsfrage nach dem Einfluss des Transportes auf die Präparate und besonders dem Einfluss, denen die Präparate ausgesetzt sind, wenn sie aus anderen Kontinenten eingeflogen werden, lässt sich anhand der retrospektiv durchgeführten Untersuchung nur partiell beantworten. Einerseits zeigt die Transportdauer keinen signifikanten Unterschied in Tagen, andererseits ist jedoch die Qualität der Zellen, gemessen vor dem Einfrieren, beeinträchtigt, was sowohl die signifikant niedrigeren Zahlen an CD34<sup>+</sup>-Zellen x 10<sup>6</sup>/kg als auch die CFU klar zeigen. Die These, dass eine verlängerte Transportzeit und -weg der Grund dafür sind, konnte mit dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Welche Faktoren diese Verschlechterung verursachen, ist mit dieser Arbeit nicht zu beantworten, da Parameter wie z.B. Temperatur während des Transportes sowie sonstige mögliche Einflussfaktoren nicht kontinuierlich gemessen wurden.

Die Ergebnisse dieser Probengruppe, die die Messungen nach Kryopreservation lieferten, zeigten deutlich, dass das Einfrieren einen großen Stress für die Zellen bedeutet. Insgesamt war die Qualität aller Proben nach dem Einfrieren und wieder Auftauen schlechter. Interessanterweise war ein signifikanter Unterschied der CD34<sup>+</sup>-Zellen zwischen den Proben mit langem Transportweg und den innereuropäischen nach dem Auftauen immer noch gegeben, jedoch zeigte die ALDH keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen den beiden Gruppen. Dies bedeutet, dass die funktionale Stammzellfähigkeit durch das Einfrieren doch so angegriffen ist, dass Faktoren wie vorheriger Transport aus fernen Ländern eine untergeordnete Rolle zu

spielen scheinen, was die Bestimmung mit CD34<sup>+</sup>-Zellen jedoch nicht so gut wiedergibt wie die Messung von SSC<sup>lo</sup>ALDH<sup>br</sup>-Zellen.

Des Weiteren stellt sich die Frage der Validität der Signifikanzen, da retrospektiv nur acht Proben zur Verfügung standen, die aus außereuropäischen Staaten kamen. Die Ergebnisse insgesamt führten zu einer Verbreiterung der vorliegenden Arbeit dahingehend, dass Untersuchungen von Proben angeschlossen wurden. Diese beleuchten den Einfluss des Einfrierens genauer, besonders auf die intrazellulär erhaltene Aktivität nach dem Einfrieren hin.

#### 4.1.2. Folgen der Kryopreservation

Im klinischen Alltag ist es wünschenswert, dass Transplantationen nach Standard ablaufen und keinerlei Komplikationen auftauchen. Es erfolgen die meisten HSCT bei allogenen Spendern mit frischen Präparaten, da durch eine Kryopreservation Risiken wie bakterielle Kontaminationen und Verschlechterung der Präparate steigen. Um nun die im nachfolgenden Abschnitt besprochenen Präparate, die im Gesamten doch nur einen kleinen Teil ausmachen, besser verstehen und beleuchten zu können, sollen hier vorab die Ergebnisse der frischen Proben diskutiert werden.

Da die CD34<sup>+</sup>-Zellen der frischen Präparate sich nicht wesentlich in den einzelnen Gruppen unterscheiden, ist davon auszugehen, dass die Art der Gewinnung, Knochenmark oder PBSC, für die frisch gegebenen Präparate, keine entscheidende Rolle spielt. Die CFU zeigte sogar, dass die PBSC-Präparate eine ausgeprägtere Fähigkeit haben, Kolonien zu formen. Auch das Engraftment dieser Präparate war von kürzerer Dauer, was jedoch bisher keinen nachgewiesenen Vorteil im Langzeitüberleben zeigte. Nur 1,4% (7 von 493) der Patienten der interdisziplinären Klinik für Stammzelltransplantation, UK-Eppendorf in Hamburg, die zwischen 2000 und 2006 frische allogene PBSC Präparate erhalten haben, litten an einem primären Transplantatversagen.

Die eingefrorenen Proben zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Die allogenen PBSC-Präparate vertragen das Einfrieren offensichtlich wesentlich schlechter, als die allogenen KM-Präparate. Die signifikant niedrigeren Daten der CFU und

der Vergleich der ALDH mit der Messung der CD34<sup>+</sup> Zellen konnten das deutlich zeigen. Wie schon vorher vermutet, zeigten die Knochenmarkproben und die autologen PBSC-Proben diesen Verlust nicht, im Gegenteil, die KM-Proben zeigten eine minimale Verbesserung nach dem Einfrieren und wieder Auftauen in der Ratio von ALDH<sup>br</sup>/CD34<sup>+</sup>-Zellen und in der CFU. Dieses Phänomen kann bis dato nur spekulativ diskutiert werden. Ob die Kryopreservation die Zellen zu erhöhter Aktivität anregt, oder ob einige frühere Progenitoren, die vorher weder CD34<sup>+</sup> noch ALDH<sup>br</sup> waren sowie keine Koloniebildungsfähigkeit zeigten durch die Kryopreservation diese Eigenschaften anschließend aufweisen ist ein noch zu erforschendes Gebiet. Der Verlust der CFU der allogenen PBSC-Proben vor und nach dem Einfrieren ist erheblich, jedoch ist die gemessene CFU nach dem Einfrieren nicht signifikant niedriger als die des Knochenmarks. Zu bedenken gilt es jedoch, dass diese quantitative Gleichheit nicht mit einer qualitativen Gleichheit einhergeht. Dies zeigte die ALDH aber auch der Spender Chimärismus, besonders in Gruppe II deutlich. Diese im Vergleich schlechteren Ergebnisse der allogenen PBSC-Proben kann mehrere Ursachen haben.

In den allogenen PBSC-Präparaten waren die Zellkonzentrationen der Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten signifikant höher als in den Knochenmarkproben und den autologen PBSC-Proben. Diese erhöhte Zellkonzentration aller drei Zelltypen fand sich auch in den allogenen 'warmen' PBSC-Proben. Auf welche Art und Weise die Zellen auf das Einfrieren reagieren und welchen Effekt sie durch ihre Reaktion auf das Überleben der Stammzellen nach dem Auftauen haben, ist bislang noch nicht abschließend geklärt. Eine mögliche negative Beeinflussung kann in einem erniedrigten pH-Wert liegen, der durch die anaerobe Verstoffwechslung der Glukose zu Laktat ein saures Milieu schafft. Im Gegensatz dazu haben die Knochenmark-Proben, geringere Zellkonzentrationen und zusätzlich den Vorteil, dass sie in ihrem natürlichen Mikromilieu von Stroma- und Fettzellen sind. Dies scheint ihnen ein Überleben trotz Kryopreservation besser zu ermöglichen als den PBSC-Zellen, die nicht in ihrem natürlichen Mikromilieu sind und eine Kryopreservation mit erhöhten Zellkonzentration und in saurerem Milieu schlechter überleben. Werden die Zellen warm gegeben, scheint die hohe Zellkonzentration keine entscheidende Rolle zu spielen. Es ist zudem denkbar, dass die hohe Zahl der

Thrombozyten beim Auftauen ein Verkleben der Zellen verursacht, das die Stammzellen beeinträchtigt. Da diese Zelltypen die Stammzellen in frischen Proben nicht in großem Ausmaß zu beeinflussen scheinen, spielt diese eventuelle Verklebung wiederum nur eine Rolle für die eingefrorenen und wieder aufgetauten Präparate.

Eine weitere Möglichkeit der Zellschädigung durch das Einfrieren könnte durch das Zusammenwirken mehrerer Stressfaktoren ihren Ursprung darin haben, dass mehrere kleinere 'Stressfaktoren' zusammenkommen und so in der Summe die Zellen beschädigen. Der Transport als solcher ist bei den meisten allogenen Präparaten ein unumgänglicher Faktor. Desgleichen ist es eine Verzögerung des Einfrierens, da es nicht zur Routine gehört und die Entscheidung für das Einfrieren mitunter erst gefällt wird, wenn das Präparat schon unterwegs ist. Kommt noch hinzu, dass der Spender nicht verwandt ist und/ oder zwischen Spender und Empfänger ein oder mehrerer HLA-Mismatches bestehen, so scheint dies das Outcome als weiterer 'kleiner' Faktor negativ zu beeinflussen.

Ein dritter zu berücksichtigender Aspekt ist der, dass eine eventuelle Verzerrung der Daten nicht ausgeschlossen werden kann. Eine gewisse Selektion in der Datenerhebung erfolgte, weil nur eine begrenzte Anzahl an Proben zur Verfügung stand.

Viertens gilt es zu berücksichtigen, dass bei der Gruppe II der allogenen cryo PBSC-Präparate alle sieben Patienten, die ein primäres Transplantatversagen hatten, auch eine reduzierte Chemotherapie vor der Transplantation durchlaufen haben. Dies stellt offensichtlich zur Diskussion, ob die Kombination von reduzierter Konditionierung und Einfrieren der Präparate für den Patienten negative Folgen hat.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Einfrieren für die Knochenmark- und autologen PBSC-Präparate keinen negativen Effekt hat, anders jedoch für die allogenen PBSC-Präparate, besonders im Zusammenhang mit einer vorangegangenen reduzierten Konditionierung.

Für alle genannten Ergebnisse gilt es immer zu berücksichtigen, dass diese Studie keine Kontrollgruppe aufweist und eine begrenzte, heterogene Kohorte in Bezug auf die Erkrankungen und ihre Stadien sowie auf die vor der Transplantation durchlaufenen Therapien ist. Auch das Alter der Spender und

Empfänger und deren Geschlecht ist nicht mit in die Kohortenauswahl eingeflossen.

#### 4.1.3. ALDH

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, wie wichtig es ist, eine genaue funktionelle Bestimmung der Stammzellfähigkeiten von Progenitoren durchzuführen. Die Messung mit Aldefluor<sup>®</sup> zeigte durchgehend niedrigere Werte für die selben Proben als sie mit CD34<sup>+</sup> gemessen wurden. Besonders die kritischen Proben, wie die allogenen cryo PBSC-Proben mit langem Transportweg, zeigten eine deutlichere Verschlechterung, die mit Aldefluor<sup>®</sup> detektiert werden konnte, ohne Aldefluor<sup>®</sup> jedoch nicht zutage getreten wäre.

Die Messung der ALDH mittels Aldefluor<sup>®</sup> als Routineuntersuchung der Präparate vor Stammzelltransplantationen einzuführen, wäre für die Patienten eine wünschenswerte Investition, da diese Messung so schnell wie die Bestimmung von Oberflächenmarkern ist und gleiche Aussagekraft über Stammzellfähigkeiten hat wie die CFU. Ist ein Präparat schlecht, so kann im letzten Moment noch eine andere Lösung gefunden werden.

Ein klinisches Beispiel soll dies zum Abschluss verdeutlichen. Ein PBSC-Präparat aus Seattle wurde gebracht und musste aus medizinischen Gründen eingefroren werden. Wie es jetzt in der interdisziplinären Klinik für Stammzelltransplantation zur Routine gehört, wurde ein Pilotröhrchen vor dem Auftauen des Präparates gemessen. Die CD34<sup>+</sup>-Zellen ergaben einen durchschnittlichen guten Wert, jedoch die Messung mit Aldefluor<sup>®</sup> zeigte nur wenige Aldefluor<sup>®</sup> positiven Zellen. Nachdem eine zweite Messung gleiche Ergebnisse lieferte, wurden daraufhin kurzfristig zwei passende Nabelschnurblut-Präparate besorgt und dem Patienten statt dessen gegeben. Der Patient zeigte einen normalen Verlauf und ein gutes Engraftment. Die CFU des PBSC-Präparates jedoch zeigte auch nach zwei Wochen keine Kolonien. Worin die Ursache auch immer gelegen haben mag, dem Patienten konnte durch rechtzeitige Intervention dank der Messung mit Aldefluor<sup>®</sup> zumindest ein komplikationsreicher Verlauf erspart, vermutlich sogar das Leben gerettet werden.

## 4.2. Schlussfolgerung und Bedeutung im internationalen wissenschaftlichen Kontext

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es nach der Kryopreservation eindeutige Unterschiede zwischen den aus dem Knochenmark und den aus dem peripheren Blut gewonnenen Stammzellen gibt. Wie Lioznov et al. 2005 beschrieben haben, zeigten auch die PBSC-Proben frischer Präparate eine größere Empfindlichkeit für Lagerung bei Raumtemperatur und bei +4°C im Vergleich zu KM-Proben. Diese Ergebnisse wurden 2006 von Antonenas et al. bestätigt. Zusätzlich konnten letztere zeigen, dass die allogenen PBSC-Proben bei der Lagerung einen größeren Verlust aufwiesen als die autologen PBSC-Proben.

Da Kryopreservation für allogene PBSC-Proben noch kein Standard ist, beziehen sich die Studien zum größten Teil auf autologe PBSC-Proben und zu geringeren Teilen auf KM-Proben und Nabelschnurblut. So zeigten Allan et al. 2002, dass die nach dem Einfrieren und wieder Auftauen gemessenen CD34<sup>+</sup>-Zellen autologer PBSC-Proben mit dem Engraftment der Empfänger korrelieren, jedoch stark vermindert sind nach dem Einfrieren und wieder Auftauen. Humpe et al. hatten schon 1997 eine Minderung der CFU autologer PBSC-Proben nach dem Einfrieren und wieder Auftauen festgestellt, jedoch eine stabile Zahl CD34<sup>+</sup>-Zellen. Auch die nachfolgenden Forschungsgruppen (Inada et al. 2001, De Boer et al. 2002, Yang et al. 2005, u.a.) zeigten ähnliche Ergebnisse mit verminderter Zellzahl und/oder verminderter CFU, aber alle für autologe PBSC-Präparate. Im Gegensatz dazu zeigte Fitz et al. 2002 eine erhöhte Zahl prozentualer CD34<sup>+</sup>-Zellen nach dem Einfrieren und wieder Auftauen, das eventuell auch seinen Ursprung in einem Verlust der MNC ohne Stammzeleigenschaften haben kann. Da im Ganzen gesehen doch die Verminderung der Stammzellen nach dem Auftauen in der Literatur überwiegt, wenn auch mit großen Spannbreiten, decken sich die hier erlangten Ergebnisse mit den Daten der vorliegenden Arbeit insofern, als auch die autologen PBSC-Proben geringe Verluste in der Zahl der CD34<sup>+</sup>-Zellen und der CFU belegten, die jedoch sehr viel weniger von den Ergebnissen vor dem Einfrieren abweichen als von den meisten genannten Autoren beschrieben. Die dem Thema dieser Arbeit am nächsten kommende Studie von Kim et al.

(2007), beschäftigt sich mit dem Vergleich frischer und nach cryo gemessener allogener PBSC-Präparate. Jedoch waren alle Spender und Empfänger verwandt, so dass die Präparate direkt nach der Gewinnung eingefroren werden konnten. Der zweite wesentliche Unterschied dieser Arbeit zu der von Kim et al. ist, dass keine Messung mittels Aldefluor<sup>®</sup> zur Anwendung kam. Die Daten der CD34<sup>+</sup>-Zellen entsprechen sich in etwa mit der vorliegenden Arbeit, jedoch die CFU zeigt in den allogenen cryo PBSC-Proben dieser Arbeit deutlich niedrigere Werte als sie Kim et al. nach dem Einfrieren beschrieben haben. Dies mag am ehesten an der längeren Lagerungszeit vor dem Einfrieren, dem Einfluss des Transports und der Inhomogenität der Proben dieser Arbeit liegen, weswegen sie in zwei Gruppen untersucht worden waren.

Die Vermutung, dass die Zellkonzentration der PLT, RBC und WBC einen negativen Einfluss auf die PBSC-Proben haben, wird von Rowley et al. 2004 nicht bestätigt. Dort wird gezeigt, dass trotz relativ hoher Konzentrationen das Outcome des Engraftments nicht beeinflusst wird. Auch hier besteht das gleiche Problem wie für die Daten der Kryopreservation: gemessen wurden nur eine exemplarische Anzahl von autologen PBSC- und KM-Proben. Die Ergebnisse die Rowley et al. schilderten stimmen mit den Ergebnissen dieser Arbeit der autologen PBSC-Proben und allogenen KM-Proben überein, denn für diese beiden Gruppen konnte kein Nachteil für die Proben in Zusammenhang mit der Zellkonzentration nach dem Einfrieren gezeigt werden. Auch Perseghin et al. konnten 1997 bestätigen, dass die Zellkonzentration der MNC von PBSC-Proben während der Kryopreservation von peripheren Blutstammzellen keinen signifikanten Einfluss auf die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen nach dem Auftauen hatte. Die Frage, welchen Effekt hohe Konzentrationen an RBC und PLT auf allogene PBSC-Präparate haben bleibt mit diesen beiden Studien jedoch ungeklärt und gibt in dieser Arbeit einen ersten Anhaltspunkt, dass doch eventuell ein negativer Zusammenhang besteht zwischen hohen Zellkonzentrationen und schlechtem Engraftment, besonders wenn die Proben noch anderen 'Stressfaktoren' wie Transport, Lagerung u. a. ausgesetzt sind.

Das Thema der ALDH findet inzwischen breites Interesse in der forschenden Öffentlichkeit. So konnten 2003 Fallon et al. für PBSC eine zu 90% überlappende Population CD34<sup>+</sup>- und ALDH<sup>br</sup>-Zellen zeigen, sowie eine

Korrelation der CFU in vitro mit der Zahl ALDH<sup>br</sup>-Zellen. Diese Ergebnisse wurden in den folgenden Jahren, von Hess et al. 2004 und Pearce et al. 2005 für Nabelschnurblut, von Hildebrandt et al. 2004 für autologe PBSC von MM und NHL-Patienten und Gentry et al. 2006 für Knochenmark bestätigt. Als Qualitätskontrolle für kryopreservierte allogene PBSC-Proben konnte Lioznov et al. 2005 zeigen, dass Proben mit wenigen ALDH<sup>br</sup>-Zellen mit schlechtem Engraftment korrelierten. Auch in dieser Arbeit diente die Messung der ALDH als Qualitätskontrolle und konnte als solche verminderte Qualität, besonders der allogenen cryo PBSC-Proben nach dem Einfrieren und wieder Auftauen detektieren, die mit alleiniger Messung der CD34<sup>+</sup>-Zellen nicht in diesem Ausmaß zutage getreten wäre.

Diese Arbeit liefert insofern neue Ergebnisse, als sie die Komponenten der Kryopreservation allogener PBSC-Präparate mit einem neuen funktionalen Marker, der ALDH, kombiniert. Wie die internationale Datenlage gezeigt hat, besteht großer Forschungsbedarf für die Beurteilung allogener Präparate nach dem Einfrieren, um die Risiken für die Patienten zu senken, da dies lebenswichtige Folgen für die diese hat. Wie die Arbeit deutlich zeigen konnte, bietet sich als geeignete Methode die Bestimmung der funktionalen Stammzellfähigkeit mittels Aldefluor<sup>®</sup>.

## 5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit, zu zeigen, welche Bedeutung der Messung der Zellen mit erhöhter Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivität zukommt wurde anhand verschiedener Kohorten durchgeführt. Eine Gruppe, bestehend aus 32 Proben, waren allogene eingefrorene und wieder aufgetaute Proben, deren Stammzellen aus dem peripheren Blut gewonnen wurden. Die zweite Gruppe umfasst 13 allogene Knochenmarkproben, die auch eingefroren und wieder aufgetaut wurden. Eine dritte Gruppe, bestehend aus 19 autologen peripheren Blutstammzellen, die ebenso eingefroren und wieder aufgetaut wurden, diente zum Vergleich.

Die Messungen zur Beurteilung der Qualität von den Stammzellen erfolgte mit 7-AAD als Marker für die Zellmembranintegrität, CD34 als Oberflächenmarker zur sicheren Selektion der Stammzellen und Aldefluor<sup>®</sup> zur Bestimmung der Zellen mit erhöhter intrazellulärer Aktivität durch das Enzym Aldehyd-Dehydrogenase. Als klinische Daten zur Beurteilung der Präparate diente die Fähigkeit der Zellen *in vitro* Kolonien zu formen und das Anwachsen der Zellen bei den Empfängern.

Die Ergebnisse zeigten, dass das Einfrieren und anschließende Auftauen den allogenen peripher gesammelten Blutstammzellen signifikant mehr schadet als den autologen Blutstammzellen und allogenen Knochenmark. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die tatsächliche Stammzellfähigkeit der Progenitorzellen signifikant niedriger ist nach dem Auftauen wenn sie mittels Aldefluor<sup>®</sup> gemessen wird und nicht nur mit 7-AAD und dem Oberflächenmarker CD34.

Die Messung mit Aldefluor<sup>®</sup>, besonders vor der Gabe eingefrorener Präparate, sollte zum Standard in jedem Transplantationszentrum werden, da so rechtzeitig erkannt wird wie viele lebendige Stammzellen tatsächlich zur Verfügung stehen und eventuell konsekutiv interveniert werden kann.

## 6 Literaturverzeichnis

- Allan DS, Keeney M, Howson-Jan K et al., (2002), Number of viable CD34(+) cells reinfused predicts engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* Jun; 29(12):967-72.
- Antonenas V, Garvin F, Webb M et al., (2006), Fresh PBSC harvests, but not BM, show temperature-related loss of CD34 viability during storage and transport. *Cytotherapy.* 8(2):158-65.
- Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J et al., (2006), Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* Aug 1;103(31):11707-12.
- Civin CI, Strauss LC, Brovall C et al., (1984), Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.* Jul;133(1):157-65.
- de Boer F, Dräger AM, Pinedo HM et al., (2002), Extensive early apoptosis in frozen-thawed CD34-positive stem cells decreases threshold doses for haematological recovery after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* Feb;29(3):249-55.
- Dyson PG, Hayes D, Rawling TP et al., (2004), Temperature monitoring - a step towards control of stem cell product during transport. (ISCT abstract) <http://www.celltherapy.org/Abstracts2004>
- Epstein RB, Storb R, Ragde H, Thomas ED., (1968), Cytotoxic typing antisera for marrow grafting in littermate dogs. *Transplantation.* Jan;6(1):45-58.
- Fallon P, Gentry T, Balber AE et al., (2003), Mobilized peripheral blood SSCloALDHbr cells have the phenotypic and functional properties of primitive haematopoietic cells and their number correlates with engraftment following autologous transplantation. *Br J Haematol.* Jul;122(1):99-108.
- Fietz T, Reufi B, Mücke C et al., (2002), Flow cytometric CD34+ determination in stem cell transplantation: before or after cryopreservation of grafts? *J Hematother Stem Cell Res.* Apr;11(2):429-35.
- Gentry T, Foster S, Winstead L et al., (2007), Simultaneous isolation of human BM hematopoietic, endothelial and mesenchymal progenitor cells by

flow sorting based on aldehyde dehydrogenase activity: implications for cell therapy. *Cytotherapy* 7; 9(3):259-274.

- Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD et al., (1989), Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med.* Oct 26;321(17):1174-8.
- Goldman JM, Schmitz N, Niethammer D, Gratwohl A., (1998), Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe in 1998. Accreditation Sub-Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* Jan;21(1):1-7.
- Goodman J.W., Hodgson G.S., (1962), Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood.* Jun;19:702-14.
- Hansen JA, Clift RA, Mickelson EM et al., (1981), Marrow transplantation from donors other than HLA identical siblings. *Hum Immunol.* Feb;2(1):31-40.
- Hess DA, Meyerrose TE, Wirthlin L et al., (2004), Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood.* Sep 15;104(6):1648-55. Epub 2004 Jun 3.
- Hildebrandt M, Held T, Gericke C et al., (2004), Comparative Assessment of Aldehyde Dehydrogenase-(ALDEFLUOR™)-Positive and CD34-Positive Hematopoietic Progenitor Cells During Stem Cell Apheresis. *Onkologie,* 27(3): 172-173
- Humpe A, Riggert J, Vehmeyer K et al., (1997), Comparison of CD34+ cell numbers and colony growth before and after cryopreservation of peripheral blood progenitor and stem cell harvests: influence of prior chemotherapy. *Transfusion.* Oct;37(10):1050-7.
- Inada H, (2001), Cryopreservation and engraftment potential of peripheral blood stem cells: pediatric experience. *Kurume Med J.*;48(2):151-7.
- Jacobson L.O., Marks E.K., Gaston E.O. et al., (1949), The role of the spleen in radiation injury. *Proc Soc Exp Biol Med,* 70 : 740
- Kessinger A, Smith DM, Strandjord SE et al., (1989), Allogeneic transplantation of blood-derived, T-cell-depleted hemopoietic stem cells after

myeloablative treatment in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant*; 4; 643-6.

- Kim DH, Jamal N, Saragosa R et al., (2007), Similar Outcomes of Cryopreserved Allogeneic Peripheral Stem Cell Transplants (PBSCT) Compared to Fresh Allografts. *Biol Blood Marrow Transplant*. 13:1233-1243
- Kohn FR, Sladek NE, (1985), Aldehyde dehydrogenase activity as the basis for the relative insensitivity of murine pluripotent hematopoietic stem cells to oxazaphosphorines. *Biochem Pharmacol*. Oct 1;34(19):3465-71.
- Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C et al., (1990) Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*. Dec 15;76(12):2462-5.
- Kröger N., Zander A.R., (2004 ), *Allogene Stammzelltherapie - Grundlagen, Indikationen und Perspektiven*. UNI-MED Verlag AG, 32
- Lioznov MV, Freiburger P, Kröger N et al., (2005), Aldehyde dehydrogenase activity as a marker for the quality of hematopoietic stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant*. May;35(9):909-14.
- Lorenz E., Uphoff D., Reid T.R., Shelton E., (1951), Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Institute*; 12:197-201
- Martin H., Hoelzer D., (2002), *Adulte Stammzellen: Fakten und Visionen. Grundlagenforschung und Therapieansätze*. *Forschung Frankfurt* 3; 31-35
- Neumann E.C., (1863), Beitrag zur Kenntnis des Zahnbein- und Knochengewebes. In: *Real-Encyclopädie der gesamten Heilkunde*. Urban & Schwarzenberg. 138-139.
- Ottinger H., Müller C., Beelen D.W. et al., (2006), Entwicklungen in der hämatopoetischen Stammzelltransplantation. *Deutsches Ärzteblatt*. Jg. 103. Heft 37.15. September
- Pearce DJ, Taussig D, Simpson C et al., (2005), Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem Cells*. Jun-Jul;23(6):752-60.
- Perseghin P, Epis R, Vigano M et al., (1997), Satisfactory recovery and viability of stem cells cryopreserved at high cell concentration. *Transfus Sci*. Sep;18(3):399-403.

- Reiffers J., (1985), Autologous transplantation in chronic myelogenous leukemia. *Rev Fr Transfus Immunohematol.* Nov;28(5):509-20.
- Rocha V, Cornish J, Sievers EL et al., (2001), Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood.* May 15;97(10):2962-71
- Rowley SD, Bensinger WI, Gooley TA, Buckner CD., (1994), Effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell cryopreservation. *Blood.* May 1;83(9):2731-6.
- Rowley SD, Goldberg SL, Pecora AL et al., (2004), Unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation for patients with hematologic malignancies using a nonmyeloablative conditioning regimen of fludarabine, low-dose total body irradiation, and rabbit antithymocyte globulin. *Biol Blood Marrow Transplant.* Nov;10(11):784-93.
- Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A et al., (1998), Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med.* Nov 26;339(22):1565-77.
- Slavin S., Nagler A., Naparstek E. et al., (1998), Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood.* 91(3): 756-763.
- Spitzer TR, Sackstein R, (2000), Graft-vs-Host Disease. In: Bolwell (Hrsg.) *Current Controversies in Bone Marrow Transplantation.* Humana Press, Totowa New Jersey; 229-230
- Sputtek A., Jetter S, Hummel K, Kühnl P., (1997), Cryopreservation of peripheral blood progenitor cells: characteristics of suitable techniques. *Beitr Infusionsther Transfusionsmed;* 34: 79-83
- Sputtek A, Sputtek R., (2004), Cryopreservation in transfusion medicine and hematology. *Life in the Frozen State* (eds. Fuller BJ. Lane N. Benson EE). CRC Press. Boca Raton.. pp. 483-504
- Stockschröder M, Krüger W, Kroschke G et al., (1995), Use of cryopreserved bone marrow in allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* Apr;15(4):569-72.
- Storb R, Deeg HJ, Whitehead J et al., (1986), Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft

versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med.* Mar 20;314(12):729-35.

- Storb R, Yu C, Wagner JL et al., (1997), Stable mixed hematopoietic chimerism in DLA-identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation. *Blood.* Apr 15;89(8):3048-54.
- Storms R.W., (1999), Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *PNAS USA*, 96: 9118-9123
- Sutherland DR, Anderson L, Keeney M et al., (1996), The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother.* Jun;5(3):213-26.
- Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW., (1957), Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med.* Sep 12;257(11):491-6.
- Trentin J.J., (1956), Mortality and skin transplantability in x-irradiated mice receiving isologous, homologous or heterologous bone marrow. *Proc Soc Exp Biol Med.* Aug-Sep;92(4):688-93
- Uni Mainz, (2007), Homepage der FACS und Array Core Facility der Universität Mainz. [www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp](http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp)
- Yang H, Acker JP, Cabuhat M et al., (2005), Association of post-thaw viable CD34+ cells and CFU-GM with time to hematopoietic engraftment. *Bone Marrow Transplant.* May;35(9):881-7.

no	allogen 'warm' PBSC nah		before cryopreservation				after thawed				HSCCT		Ex.leth.					
	Date of cryo	days	Match	PLT x10e6/ml	WBC x10e6/ml	CD34+ %	CD34+ x10e6/kg	CFU x10e5/kg	CD34+ %	CD34+7AAD- %	CD34+7AAD- x10e6/kg	ALDH+ %		ALDH/CD34 ratio	ALDH+ x10e6/kg	engraftment L>1000/ul (day)	chimerism	relapse
1	21.07.2004	2	m	n.a.	362,82	0,89	12,95	19,10	1,18	0,78	11,36	0,60	0,53	0,73	15	full	relapse	
2	10.04.2004	2	mm	n.a.	533,71	0,45	1,67	56,00	0,16	0,05	0,49	0,30	0,69	0,90	20	full	relapse	
3	10.06.2004	1	mm	n.a.	350,00	0,53	3,30	42,00	0,39	0,34	3,82	0,39	0,31	0,44	16	full	CR	
4	10.06.2004	1	mm	n.a.	497,16	0,53	3,30	64,00	0,59	0,44	3,03	0,40	0,69	0,72	15	full	relapse	
5	26.02.2005	2	m	n.a.	497,16	0,53	6,56	94,00	0,69	0,64	3,03	0,46	0,69	0,72	15	full	relapse	
6	01.10.2004	2	m	n.a.	362,82	0,71	7,71	8,70	0,69	0,48	6,21	0,48	0,81	0,74	18	full	CR	
7	22.10.2004	2	m	n.a.	344,15	1,34	13,50	30,30	0,67	0,53	5,35	0,53	0,34	2,63	16	full	CR	
8	15.12.2004	1	mm	n.a.	253,86	1,32	14,31	3,95	0,80	0,84	6,26	0,50	0,68	3,73	19	full	relapse	
9	16.12.2004	2	mm	n.a.	276,84	0,31	6,50	37,60	0,88	0,06	1,25	0,07	0,88	1,46	10	full	relapse	
10	08.03.2005	2	m	n.a.	278,13	1,43	12,72	54,30	0,61	0,42	3,74	0,30	0,49	2,67	12	full	relapse	
11	06.04.2005	3	m	n.a.	324,71	1,45	13,30	47,30	0,76	0,44	6,52	0,44	0,56	4,04	11	full	relapse	
12	11.02.2005	2	m	n.a.	209,00	1,22	10,96	16,30	1,29	1,09	0,22	1,23	0,95	11,03	13	full	relapse	
13	13.02.2005	2	m	n.a.	404,88	0,46	0,63	27,17	0,51	0,30	6,22	0,00	0,00	0,00	16	full	relapse	
14	26.02.2005	2	mm	n.a.	313,02	0,37	6,83	23,90	0,07	0,01	7,15	0,03	0,43	0,55	15	full	CR	
15	02.06.2005	2	m	n.a.	198,86	1,30	8,33	22,40	1,21	1,18	7,55	1,07	0,88	6,85	15	full	CR	
16	01.07.2005	2	m	n.a.	249,39	0,95	4,60	28,80	0,60	0,54	4,44	0,36	0,60	2,96	22	full	CR	
17	08.07.2005	2	mm	n.a.	272,82	1,01	11,80	32,30	0,69	0,56	6,57	0,41	0,59	4,81	n.a.	full	CR	
18	09.09.2005	1	m	n.a.	222,89	0,80	13,60	81,60	0,61	0,52	8,84	0,48	0,79	8,16	14	full	CR	
19	10.09.2005	2	m	n.a.	449,58	1,17	16,70	121,00	0,51	0,22	3,15	0,02	0,04	0,29	15	full	relapse	
20	14.09.2005	0	m	n.a.	373,88	1,19	15,00	29,00	0,99	0,06	0,76	0,06	0,02	0,25	15	full	CR	
21	06.10.2005	1	m	n.a.	125,03	0,68	4,30	9,80	0,67	0,62	4,58	0,51	0,76	3,76	15	full	relapse	
22	14.10.2005	2	mm	n.a.	362,05	0,29	4,00	27,00	0,59	0,47	6,39	0,50	0,70	4,76	17	full	relapse	
23	09.11.2005	2	m	n.a.	287,84	0,66	8,18	39,40	0,34	0,25	3,69	0,30	0,68	4,38	13	full	CR	
24	25.11.2005	2	m	n.a.	296,83	0,36	4,38	20,60	0,77	0,16	1,94	0,14	0,82	1,70	11	full	relapse	
25	06.12.2005	2	m	n.a.	201,87	1,91	14,20	36,00	1,46	1,29	9,61	1,01	0,70	7,52	15	full	CR	
26	21.12.2005	2	mm	n.a.	259,14	1,10	9,00	25,30	0,89	0,97	7,92	0,85	0,68	6,94	15	full	relapse	
27	23.12.2005	2	mm	n.a.	292,83	1,06	11,50	59,70	1,15	0,79	8,48	1,15	0,72	1,52	15	full	CR	
28	30.12.2005	1	m	n.a.	325,93	0,64	8,50	54,00	0,48	0,44	5,44	0,41	0,65	5,44	12	full	relapse	
29	26.01.2006	2	mm	n.a.	244,11	0,71	7,20	27,40	0,65	0,78	7,82	0,73	0,68	7,41	11	full	relapse	
30	26.01.2006	1	m	n.a.	213,04	0,37	13,90	33,00	0,72	1,10	14,22	0,61	0,72	10,07	16	full	CR	
31	02.02.2006	1	mm	n.a.	213,04	0,39	17,60	33,00	0,52	0,63	14,22	0,56	0,78	9,82	12	full	CR	
32	03.02.2006	1	mm	n.a.	213,04	0,39	17,60	33,00	0,52	0,63	14,22	0,56	0,78	9,82	12	full	relapse	
33	03.02.2006	2	mm	n.a.	314,42	0,31	8,00	43,00	0,86	0,30	7,38	0,30	0,13	3,82	16	full	relapse	
34	09.02.2006	0	m	n.a.	192,81	1,66	8,00	22,00	1,53	1,78	4,56	1,23	0,67	4,92	12	full	CR	
35	01.03.2006	2	m	n.a.	202,02	0,75	4,96	24,40	0,83	0,73	4,96	0,47	0,53	3,16	20	full	relapse	
36	01.03.2006	2	mm	n.a.	338,86	1,19	12,20	32,00	1,30	1,15	11,79	1,14	0,88	11,69	19	full	relapse	
37	07.03.2006	2	mm	n.a.	273,09	0,62	9,78	20,60	1,14	0,95	14,93	0,94	0,82	14,78	19	full	CR	
38	20.04.2006	2	mm	n.a.	249,86	1,23	9,78	25,40	0,60	0,40	3,18	0,11	0,18	0,87	19	full	CR	
39	26.04.2006	2	m	n.a.	196,95	0,47	4,90	25,40	1,03	0,92	9,58	0,91	0,88	9,47	17	full	CR	
40	04.05.2006	2	m	n.a.	286,07	0,71	6,64	26,70	1,00	0,84	7,74	0,85	0,85	7,63	14	full	CR	
41	11.05.2006	1	m	n.a.	311,04	1,41	18,96	18,80	1,14	0,88	9,14	1,10	0,99	1,34	14	full	CR	
42	17.05.2006	2	mm	n.a.	321,87	0,79	10,00	22,59	1,40	0,95	12,06	0,62	0,44	7,67	12	full	relapse	
43	19.05.2006	2	m	n.a.	326,86	0,33	7,65	14,87	0,40	0,16	3,66	0,14	0,35	3,20	10	full	CR	
44	24.05.2006	1	mm	n.a.	310,01	0,91	15,00	46,00	0,95	0,80	13,19	0,71	0,75	11,71	10	full	CR	
45	15.06.2006	2	mm	n.a.	360,00	0,88	9,31	16,30	1,31	1,24	13,95	0,63	0,48	7,09	12	full	CR	
46	26.07.2006	2	mm	n.a.	206,12	1,25	8,06	20,00	1,21	0,83	5,36	0,14	0,14	0,90	13	full	relapse	
47	08.08.2006	2	m	n.a.	197,04	0,44	7,10	10,60	1,10	0,97	10,45	1,07	0,41	10,25	10	full	CR	
48	10.08.2006	2	m	n.a.	332,36	1,21	14,10	24,70	2,25	1,98	22,99	1,07	0,48	12,42	19	full	relapse	
49	30.08.2006	0	m	n.a.	238,84	0,89	8,80	9,50	0,29	0,02	0,20	0,24	0,83	9,20	9	full	relapse	
50	15.09.2006	1	m	n.a.	197,08	0,78	4,03	10,30	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,00	16	full	CR	
51	27.09.2006	2	m	n.a.	212,83	0,47	1,76	6,40	0,59	0,66	2,09	0,45	0,50	1,68	10	full	CR	
52	26.09.2006	2	mm	n.a.	294,80	0,51	5,17	10,45	0,71	0,56	6,70	0,42	0,59	4,26	11	full	CR	
53	28.09.2006	2	mm	n.a.	37,93	0,60	4,56	19,10	1,11	1,05	8,02	0,82	0,71	6,26	12	full	CR	
54	28.09.2006	1	mm	n.a.	362,89	0,50	11,14	20,00	0,29	0,17	3,78	0,40	1,38	8,80	18	full	relapse	
MV		1,71	m=71%	16,2	276,72	0,89	9,42	31,16	0,86	0,67	7,15	0,53	0,63	5,17	13,87	full=62%	r=52%	
SD		0,58	mm=29%	5,27	70,18	0,42	4,08	22,65	0,44	0,43	4,71	0,35	0,24	3,75	4,17	no=38%	CR=48%	
CI		0,17		3,77	19,15	0,12	1,18	6,65	0,13	0,12	1,30	0,10	0,07	1,02	1,15		F=35%	

Tabelle I: allogen 'warm' PBSC nah

allogene 'warm' PBSC weit		before cryopreservation										after thawed						HSCt		
		Date of		Match	days	PLT x10 <sup>6</sup> /ml	WBC x10 <sup>6</sup> /ml	CD34+ %	CD34+ x10 <sup>6</sup> /kg	CFU x10 <sup>5</sup> /kg	CD34+ %	CD34+7AAD- %	CD34+7AAD- x10 <sup>6</sup> /kg	ALDH+ %	ALDH+ ratio	ALDH+ x10 <sup>6</sup> /kg	engraftment L>1000/ $\mu$ l (day)	chimerism	relapse	Ex.leth.
		no	cryo																	
1	17.11.05	2	m	15,00	109,79	0,23	0,74	5,20	0,20	0,16	0,52	0,18	0,90	0,52	0	no	relapse	alive		
2	21.11.05	4	m	n.a.	237,08	0,62	6,4	n.a.	0,49	0,41	4,24	0,4	0,82	3,51	13	full	relapse	alive		
3	23.08.06	2	mm	n.a.	317,00	0,52	5,9	14,06	0,50	0,34	3,86	0,25	0,50	2,15	15	full	CR	alive		
4	22.12.04	2	m	15,00	267,04	1,11	12,23	46,20	0,39	0,26	2,87	0,21	0,54	2,09	15	full	CR	alive		
5	23.03.06	3	mm	14,00	194,83	0,52	2,83	8,20	0,28	0,02	0,11	0,01	0,04	0,00	15	no	relapse	06.03.07		
6	07.06.06	2	m	n.a.	197,96	0,74	11,2	51,00	0,61	0,49	7,41	0,4	0,66	5,30	10	no	CR	05.11.06		
7	13.09.06	1	mm	n.a.	243,76	0,32	0,96	2,30	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	18	full	relapse	alive		
8	07.09.05	0	mm	n.a.	161,97	0,54	3,72	8,30	0,48	0,39	2,68	0,29	0,60	1,92	15	full	relapse	10.09.06		
<b>MV</b>		<b>2</b>	<b>m=50%</b>	<b>14,67</b>	<b>216,18</b>	<b>0,58</b>	<b>5,49</b>	<b>19,32</b>	<b>0,42</b>	<b>0,38</b>	<b>3,71</b>	<b>0,25</b>	<b>0,58</b>	<b>2,21</b>	<b>12,63</b>	<b>full=63%</b>	<b>r=63%</b>			
<b>SD</b>		<b>1,2</b>	<b>mm=50%</b>	<b>0,58</b>	<b>64,36</b>	<b>0,27</b>	<b>4,35</b>	<b>20,36</b>	<b>0,14</b>	<b>0,29</b>	<b>2,86</b>	<b>0,14</b>	<b>0,28</b>	<b>1,78</b>	<b>5,58</b>	<b>no=37%</b>	<b>CR=37%</b>			
<b>CI</b>		<b>1</b>		<b>1,43</b>	<b>53,81</b>	<b>0,23</b>	<b>3,63</b>	<b>18,83</b>	<b>0,13</b>	<b>0,24</b>	<b>2,39</b>	<b>0,13</b>	<b>0,26</b>	<b>1,65</b>	<b>4,66</b>					
<b>p</b>		<b>0,20</b>	<b>0,31</b>	<b>0,52</b>	<b>0,03</b>	<b>0,048</b>	<b>0,01</b>	<b>0,19</b>	<b>0,02</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	<b>0,07</b>	<b>0,67</b>	<b>0,045</b>	<b>0,19</b>					

Tabelle II: allogene 'warm' PBSC 'weit'

PBSC allo 'cryo'		before frozen										after thawed										HSCT	
no	Date of frozen	RBC x10e9/ml	PLT x10e6/ml	WBC x10e6/ml	CD34+ %	CD34+ x10e6/kg	CD34+ x10e6/kg	CFU x10e5/kg	CD34+ %	CD34+ MI %	CD34+7AAD- x10e6/kg	ALDH+ %	ALDH/CD34 ratio	ALDH+ x10e6/kg	CFU x10e5/kg	engraftment L>1000/µl (day)	chimerism						
1	26.09.2000	0,241	1526	143	0,95	4,3	11,8	1,7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,83	graft failure	no							
2	15.08.2000	0,451	2760	360	0,34	4,2	1,7	1,7	0,41	91	3,5	0,36	0,88	3,3	0,9	17	full (d18)						
3	11.09.2001	n.a.	n.a.	327	0,82	8,8	40,1	40,1	0,56	83	3	0,45	0,80	2,9	2,6	15	mixed						
4	03.08.2001	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	2,2	63	63	0,45	84	3,2	0,13	0,29	1,3	0,2	graft failure	no						
5	15.02.2002	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	13,7	31,9	31,9	0,54	68	5,6	0,15	0,28	2,28	0,3	no	no						
6	26.03.2002	0,578	3771	389	0,60	9,1	154	154	0,42	75	4,1	0,16	0,38	2,7	2	16	mixed						
7	17.01.2002	0,451	3814	238	0,52	2,6	8,74	8,74	0,33	96	3,4	0,27	0,82	3,3	3,2	11	full (d49)						
8	22.01.2002	0,338	1965	343	0,38	4,9	39,3	39,3	0,23	90	2,6	0,22	0,96	2,75	2,2	16	full (d25)						
9	26.04.2002	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	8,7	95,4	95,4	0,64	98	5,5	0,44	0,69	3,9	4,36	12	full (d23)						
10	12.11.2002	0,574	2253	260	2,03	33,5	84,7	84,7	1,17	96	10	1,09	0,93	9,7	18,5	13	full (d25)						
11	11.04.2003	0,348	1968	148	0,65	9,7	58	58	0,56	81	5,8	0,18	0,32	2,2	1,5	graft failure	no						
12	03.06.2003	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	27,7	150	150	0,71	77	9,8	0,19	0,27	3,4	0,6	21	mixed						
13	20.05.2003	0,731	2135	169	1,41	19,45	77	77	0,59	96	9,6	0,58	0,98	9,73	39	18	full (d89)						
14	23.05.2003	0,65	4019	216	1,31	11,5	35,3	35,3	0,48	93	4,6	0,48	1,00	4,7	2,5	16	full (d21)						
15	05.06.2003	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	6,91	30,3	30,3	0,51	97	8,4	0,51	1,00	7,5	5,6	14	n.a.						
16	18.06.2003	0,964	2234	136	1,08	7,55	34,6	34,6	0,59	78	6,9	0,59	1,00	6,2	1,4	17	full (d42)						
17	06.05.2004	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	7,02	35	35	0,3	19	1,11	0,08	0,27	0,89	0,9	graft failure	no						
18	16.07.2004	0,545	1080	186	0,77	13,02	47	47	0,5	76	2,81	0,46	0,92	2,71	1,8	13	full (d93)						
19	21.07.2004	0,908	2098	138	1,78	16,7	66	66	0,63	63	6,17	0,43	0,68	2,92	7,2	12	full (d59)						
20	29.09.2004	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	23,25	73,8	73,8	0,82	50	3,74	0,7	0,85	3,76	1,6	22	full (d33)						
21	29.09.2004	0,356	2274	345	0,55	10,09	49	49	0,43	74	3,66	0,35	0,81	2,75	17,8	20	full (d39)						
22	21.01.2005	0,582	2456	191	0,42	10,8	11,3	11,3	0,31	59	4,73	0,25	0,81	3,69	3,6	16	full (d27)						
23	01.06.2005	0,531	1820	166	1,15	20,2	49	49	0,53	61	5,88	0,39	0,74	3,72	2,6	15	full (d29)						
24	08.09.2005	0,491	1620	69,8	0,99	15,5	14,15	14,15	0,52	89	13,32	0,33	0,63	9,16	24,9	17	full (d46)						
25	23.12.2005	0,43	2248	163	1,07	10,25	27,7	27,7	0,57	60	4,32	0,15	0,26	1,62	3,9	no	no						
26	23.12.2005	0,741	2348	347	0,41	5,8	25,5	25,5	0,89	77	5,84	0,78	0,88	4,36	3,5	18	full (d26)						
27	02.03.2006	0,799	3362	277	1,27	16,6	30	30	0,68	94	10,88	0,66	0,97	10,56	21,9	25	mixed						
28	08.06.2006	0,158	1064	95,7	0,52	2,2	2,6	2,6	0,96	99	5,82	0,92	0,96	5,48	10,4	12	full (d152)						
29	16.08.2006	0,408	1920	157	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,98	95	6,85	0,84	0,86	6,21	13	14	mixed						
30	15.09.2006	0,718	2386	157	1,17	6,03	10,3	10,3	0,71	99	5,63	0,69	0,97	5,56	11,3	16	full (d24)						
31	20.10.2006	0,519	1499	117	0,51	3,95	14,4	14,4	0,36	51	1,92	0,18	0,50	1,79	5,3	graft failure	no						
32	10.11.2006	0,918	2150	197	1,03	10,78	33,7	33,7	0,51	32	1,98	0,17	0,33	1,82	1,1	no	no						
MV		0,56	2282,08	213,42	0,91	11,19	45,33	45,33	0,58	77,45	5,50	0,43	0,71	4,29	6,77	16,08							
SD		0,21	785,57	92,05	0,45	7,53	37,39	37,39	0,21	20,29	2,88	0,26	0,27	2,64	8,88	3,43							
CI		0,074	272,180	31,892	0,156	2,610	12,954	12,954	0,074	7,031	0,999	0,090	0,094	0,914	3,076	1,187							

Tabella III: allogene PBSC 'cryo'

PBSC allo 'cryo' Gruppe I																
no	Date of frozen	before frozen					after thawed					HSCT				
		RBC x10e9/ml	PLT x10e6/ml	WBC x10e6/ml	CD34+ %	CD34+ x10e6/kg	CFU x10e5/kg	CD34+ %	CD34+ MI %	CD34+7AAD- x10e6/kg	ALDH+ %	ALDH/CD34 ratio	ALDH+ x10e6/kg	CFU x10e5/kg	conditioning	engraftment L>1000/ $\mu$ l (day)
1	26.09.2003	0,261	1596	143	0,95	4,3	11,8	n.a.	n.a.	n.a.	0,83	n.a.	0,83	reduced	graft failure	no
2	15.09.2003	0,451	2760	360	0,34	4,2	1,7	0,41	3,5	0,88	0,9	3,3	0,9	reduced	graft failure	no
3	11.09.2001	n.a.	n.a.	327	0,82	8,8	40,1	0,95	83	0,26	2,6	2,9	2,6	standard	15	no
4	17.01.2002	0,451	3814	238	0,59	2,6	8,74	0,33	96	0,27	3,4	3,3	3,2	standard	11	no
5	22.01.2002	0,388	1885	343	0,88	4,9	38,3	0,23	50	0,22	2,6	2,6	2,2	standard	16	no
6	26.04.2002	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	8,9	85,4	0,64	88	0,44	5,5	3,9	4,36	reduced	12	no
7	16.11.2002	0,974	2283	280	0,33	3,3	64,7	0,83	86	0,29	3,7	3,7	18,5	reduced	13	no
8	21.02.2003	0,155	2435	245	0,45	10,5	64,7	0,15	82	0,88	4,6	6,7	2,2	reduced	18	no
9	21.05.2003	0,155	2435	245	0,45	10,5	64,7	0,15	82	0,88	4,6	6,7	2,2	reduced	18	no
10	05.05.2003	0,155	2435	245	0,45	10,5	64,7	0,15	82	0,88	4,6	6,7	2,2	reduced	18	no
11	16.08.2003	0,824	2234	138	1,08	6,9	30,3	0,51	97	0,51	8,4	7,5	5,3	standard	14	no
12	16.07.2004	0,545	1880	168	0,77	13,02	47	0,32	76	0,46	6,9	2,71	1,8	standard	13	no
13	21.07.2004	0,808	2098	138	1,78	16,7	66	0,32	63	0,38	6,17	2,92	7,2	reduced	12	no
14	20.09.2004	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	20,25	73,8	0,82	50	0,7	3,74	3,76	1,6	reduced	22	no
15	20.09.2004	0,365	2274	345	0,55	10,89	49	0,43	74	0,35	3,66	2,75	17,8	standard	20	no
16	21.01.2005	0,582	2456	191	0,42	10,8	11,3	0,31	59	0,25	4,73	3,69	3,6	reduced	16	no
17	01.06.2005	0,581	1820	168	1,15	20,2	49	0,53	81	0,30	3,72	3,72	2,6	reduced	15	no
18	06.09.2005	0,481	1820	69,8	0,89	16,5	14,15	0,52	89	0,33	13,32	9,16	24,9	reduced	17	no
19	23.12.2005	0,741	2348	347	0,41	5,8	25,5	0,88	77	0,78	5,84	4,36	3,5	reduced	18	no
20	02.03.2006	0,789	3382	277	1,27	16,6	30	0,88	84	0,86	10,88	10,56	21,9	reduced	25	no
21	16.08.2006	0,408	1820	157	n.a.	n.a.	n.a.	0,88	95	0,86	6,85	6,21	19	reduced	14	no
22	06.05.2006	0,189	1054	57,7	0,52	2,2	2,6	0,95	89	0,92	5,62	5,48	10,4	standard	12	no
23	15.09.2006	0,718	2386	157	1,17	6,03	10,3	0,71	89	0,68	5,63	5,58	11,3	standard	16	no
MV		0,56	2270,21	216,08	0,94	11,48	38,07	0,61	84,28	0,54	6,03	5,22	8,73		15,86	
SD		0,21	769,27	88,31	0,47	7,58	26,84	0,23	14,55	0,22	2,79	2,50	9,57		3,33	
CI		0,086	314,384	36,092	0,193	3,097	10,970	0,094	5,947	0,091	1,141	1,023	3,910		1,363	

PBSC allo 'cryo' Gruppe II																
no	Date of frozen	before frozen					after thawed					HSCT				
		RBC x10e9/ml	PLT x10e9/ml	WBC x10e6/ml	CD34+ %	CD34+ x10e6/kg	CFU x10e5/kg	CD34+ %	CD34+ MI %	CD34+7AAD- x10e6/kg	ALDH+ %	ALDH/CD34 ratio	ALDH+ x10e6/kg	CFU x10e5/kg	conditioning	engraftment L>1000/ $\mu$ l (day)
1	03.06.2001	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	2,2	63	0,45	84	0,13	3,2	1,3	0,2	reduced	graft failure	no
2	15.02.2002	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	13,7	31,9	0,54	68	0,15	5,6	2,28	0,3	reduced	no	no
3	26.03.2002	0,578	3771	389	0,60	9,1	154	0,38	75	0,16	4,1	4,1	2	standard	16	no
4	11.04.2003	0,348	1968	148	0,65	9,7	58	0,56	81	0,18	5,8	2,2	1,5	reduced	graft failure	no
5	03.06.2003	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	27,7	150	0,71	77	0,19	3,8	3,4	0,6	standard	21	no
6	06.06.2004	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	7,02	35	0,3	19	0,08	0,88	0,88	0,9	reduced	graft failure	no
7	23.12.2005	0,43	2248	163	1,07	10,25	27,7	0,57	60	0,15	4,32	1,11	1,69	reduced	no	no
8	20.10.2006	0,513	1489	117	0,51	3,85	4,4	0,50	51	0,18	1,92	1,73	5,3	reduced	graft failure	no
9	04.11.2006	0,618	2180	197	1,03	10,18	33,7	0,51	32	0,17	1,98	1,68	1,1	standard	no	no
MV		0,56	2327,20	202,80	0,77	10,49	63,08	0,49	60,77	0,15	4,20	2,00	1,76		18,50	
SD		0,22	856,91	108,00	0,26	7,35	52,55	0,12	22,83	0,03	2,66	0,75	1,74		3,54	
CI		0,365	1520,407	132,493	0,504	6,853	41,210	0,321	39,704	0,101	2,746	1,307	1,147		12,086	
p		0,991	0,889	0,780	0,467	0,745	0,091	0,155	0,002	0,00003	0,110	0,001	0,044		0,308	

Tabelle IV: allogene PBSC 'cryo' Gruppe I und Gruppe II

KM allo	before frozen											after thawed											HSCT	
	RBC	PLT	WBC	CD34+	CD34+	CD34+	CFU	CD34+	CD34+	CD34+ MI	CD34+7AAD-	ALDH+	ALDH/CD34	ALDH+	CFU	engraftment	chimerism							
	x10e9/ml	x10e6/ml	x10e6/ml	%	x10e6/kg	x10e5/kg	x10e6/kg	%	%	%	x10e6/kg	%	ratio	x10e6/kg	x10e5/kg	L>1000/ $\mu$ l								
1	n.a.	n.a.	n.a.	1,91	2,81	3,46	n.a.	7,77	18	n.a.														
2	n.a.	n.a.	66	1,32	1,9	2,82	1,34	90	1,98	1,35	1,01	2,01	3,24	3,24	16	full (d37)								
3	0,05	47	86	1,22	3,01	1,44	1,33	91	3,47	1,31	0,99	3,41	1,6	1,6	16	full (d60)								
4	n.a.	n.a.	n.a.	1,85	4,2	3,23	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	2,81	2,81	14	n.a.								
5	0,01	35	122	1,2	3,82	3,84	1,92	90	4,63	1,82	0,95	4,3	3,94	3,94	19	full (d34)								
6	n.a.	n.a.	n.a.	1,53	5,6	12,2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	10,2	10,2	15	full (d35)								
7	0,01	54	82	2,01	8	17,3	2,29	89	12,24	2,59	1,13	13,85	19,3	19,3	12	full (d32)								
8	0,02	46	85	1,04	1,64	3,45	2,3	82	5,1	2,27	0,99	5,06	2,52	2,52	21	n.a.								
9	n.a.	n.a.	n.a.	2,48	5,8	3,9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	3,7	3,7	n.a.	n.a.								
10	0,03	50	181	1,55	10	3,8	2,32	92	20,27	2,3	0,99	20,03	12,4	12,4	17	full (d32)								
11	n.a.	n.a.	n.a.	2,17	2,83	4,74	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	4,48	4,48	16	full (d34)								
12	0,01	52	123	1,81	1,9	3,84	2,69	93	7,46	2,58	0,96	7,15	4,2	4,2	19	n.a.								
13	n.a.	n.a.	49	1,38	3,27	8	2,51	87	3,88	2,59	1,03	3,92	7,8	7,8	22	full (d43)								
<b>MV</b>	<b>0,022</b>	<b>47</b>	<b>99</b>	<b>1,65</b>	<b>4,21</b>	<b>5,54</b>	<b>2,09</b>	<b>89</b>	<b>7,38</b>	<b>2,10</b>	<b>1,01</b>	<b>7,47</b>	<b>6,46</b>	<b>6,46</b>	<b>17,08</b>									
<b>SD</b>	<b>0,01</b>	<b>6,16</b>	<b>38,85</b>	<b>0,41</b>	<b>2,42</b>	<b>4,29</b>	<b>0,48</b>	<b>3,23</b>	<b>5,69</b>	<b>0,51</b>	<b>0,05</b>	<b>5,85</b>	<b>4,83</b>	<b>4,83</b>	<b>2,75</b>									
<b>CI</b>	<b>0,008</b>	<b>3,346</b>	<b>21,116</b>	<b>0,223</b>	<b>1,314</b>	<b>2,331</b>	<b>0,261</b>	<b>1,756</b>	<b>3,094</b>	<b>0,275</b>	<b>0,028</b>	<b>3,177</b>	<b>2,626</b>	<b>2,626</b>	<b>1,496</b>									

Tabelle V: allogenen KM

auto PBSC		before frozen						after thawed						HSCT	
		Date of frozen	RBC x10e9/ml	PLT x10e6/ml	WBC x10e6/ml	CD34+ %	CD34+ x10e6/kg	CD34+ %	CD34+ MI %	CD34+7AAD- x10e6/kg	ALDH+ %	ALDH/CD34 ratio	ALDH+ x10e6/kg	engraftment L>1000/µl (day)	
1	23.05.06	0,373	1295	119	1,68	4,2	0,69	77	1,55	0,48	0,70	1,2	13		
2	27.06.06	0,281	447	135	2,84	16,3	4,64	95	25,92	3,64	0,78	20,92	10		
3	20.06.06	0,385	1829	175	0,45	2,1	0,29	97	1,3	0,2	0,69	0,93	12		
4	22.07.06	0,304	1432	99,6	3,02	8,5	2,47	93	6,62	1,77	0,72	4,99	12		
5	07.09.06	0,372	1520	172	0,88	2,1	0,44	91	1	0,44	1,00	1,05	12		
6	05.10.06	0,678	1150	64,3	5,41	8,6	4,92	91	7,13	2,91	0,69	3,99	12		
7	20.09.06	0,26	244	75	1,73	2	0,42	87	0,39	0,33	0,79	0,38	10		
8	06.11.06	0,25	1005	163	4,87	23,7	4,36	90	19,52	3,94	0,90	19,18	11		
9	06.12.06	0,545	1780	243	1,90	14,2	1,05	86	6,94	0,64	0,61	4,78	11		
10	20.01.05	0,386	809	96	0,53	0,6	0,7	94	0,75	0,47	0,67	0,53	11		
11	09.02.05	0,194	1761	220	0,19	1,5	0,14	63	0,32	0,11	0,79	0,89	11		
12	16.03.05	0,289	2304	392	0,74	7,1	0,38	85	3,06	0,32	0,84	3,06	11		
13	29.04.05	0,095	146	147	2,01	12	2,95	91	10,69	2,72	0,92	10,61	12		
14	01.06.05	0,297	1709	269	0,27	1,9	0,18	83	0,56	0,14	0,78	0,98	11		
15	07.06.05	n.a.	n.a.	212	0,16	0,8	0,11	98	0,55	0,12	1,03	0,6	12		
16	22.09.05	0,551	3115	376	0,77	8,3	0,34	38	1,29	0,3	0,88	0,32	11		
17	06.12.05	0,752	267	195	0,48	1,8	0,25	85	0,75	0,17	0,68	0,26	11		
18	07.12.05	0,349	1259	230	0,77	3,9	1,19	90	5,65	0,84	0,71	2,72	13		
19	16.12.05	0,691	1814	227	0,78	2,3	0,53	91	1,5	0,36	0,68	0,77	12		
<b>MV</b>		<b>0,392</b>	<b>1327</b>	<b>190</b>	<b>1,55</b>	<b>6,42</b>	<b>1,37</b>	<b>86</b>	<b>5,03</b>	<b>1,05</b>	<b>0,78</b>	<b>4,11</b>	<b>11,47</b>		
<b>SD</b>		<b>0,181</b>	<b>771</b>	<b>90</b>	<b>1,52</b>	<b>6,31</b>	<b>1,64</b>	<b>14</b>	<b>7,00</b>	<b>1,27</b>	<b>0,12</b>	<b>6,16</b>	<b>0,84</b>		
<b>CI</b>		<b>0,081</b>	<b>346,635</b>	<b>40,503</b>	<b>0,686</b>	<b>2,839</b>	<b>0,738</b>	<b>6,230</b>	<b>3,148</b>	<b>0,573</b>	<b>0,053</b>	<b>2,771</b>	<b>0,378</b>		

Tabelle VI: autolog PBSC

## 8. Anhang

### 8.1. Abbildungsverzeichnis

- **Abb 1:** Vorläuferzelle des hämatopoetischen Systems (Elektronenmikroskopie) aus: Zucker-Franklin et al., (1988), Atlas of Blood Cells. Vol. 1., Philadelphia: Lea & Febinger. p6. [98]
- **Abb 2:** Nutzung von Knochenmark (KM) und peripheren Blutstammzellen (PB) als Stammzellquelle für die allogene HSZT in Deutschland im Zeitraum von 1998–2005. aus: Ottinger H., Müller C., Beelen D.W. et al., (2006), Entwicklungen in der hämatopoetischen Stammzelltransplantation. Deutsches Ärzteblatt.Jg. 103.Heft 37.15. September

### 8.2. Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
a/cGvHD	akute/chronische Graft versus Host Disease
ABMDR	Australien Bone Marrow Donor Registry
ACD-A	Anticoagulant Citrate Dextrose Solution Formula-A
ALDH	Aldehyde-Dehydrogenase
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
ASHI	American Society for Histocompatibility and Immunogenetics
BMDW	Bone Marrow Donors Worldwide
CD	Cluster of Differentiation
CFU (-GM)	Colony Forming Unit (Granulozyten, Makrophagen)
CLL	Chronisch-lymphatische Leukämie
CML	Chronisch-myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
DEAB	Diethylaminobenzaldehyd

DLI	Donor Lymphozyten Infusion
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBMT	European Group for Blood and Marrow Transplantation
EFI	European Federation of Immunogenetics
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GvL	Graft versus Leukemia
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HSC(T)	Haematopoietic stem cell (transplantation)
HTLV	Humanes T-Zellleukämievirus
ISHAGE	International Society of Haematotherapy and Graft Engineering
KG	Körpergewicht
KM(T)	Knochenmark (Transplantation)
lin	lineage
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MNC	Mononuclear Cells
MPS	Myeloproloferatives Syndrom
MV	Mean Value
NMDP	National Marrow Donor Program
PBS	Phosphate-buffered saline
PBSC(T)	Periphere blood stem cell (transplantation)
PE	Phycoerythrin (Fluorochrom)
PLT	Platelets
RBC	Red blood cells
SD	Standard Deviation
UCB	Umbilical Cord Blood
VCAM	Vascular cell adhesion molecule-1
WBC	White blood cells
ZKRD	Zentrales Knochenmarkspender-Register

## Danksagung

Herrn Professor Dr. Zander danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und das Eingehen auf meine Bedürfnisse, besonders gegen Ende hin.

Ganz besonders möchte ich Herrn Dr Lioznov herzlichst danken, der mich bei dieser Arbeit hervorragend betreut hat und an den ich mich mit allen Fragen und Nöten jederzeit wenden konnte.

Für die freundliche Unterstützung im Labor von Frau Freiberger, sowie im Institut für Transfusionsmedizin von Frau Merle möchte ich mich sehr bedanken. Des Weiteren sei Frau Amtsfeld gedankt für Ihre freundliche Unterstützung.

Herrn Dr. Sputtek danke ich für die freundliche Kooperation und Bereitstellung der Daten.

Ein besonderer Dank geht an Nina und meine Mutter, ohne deren seelischen Beistand ich diese Arbeit nicht hätte verfassen können.

## EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Datum: 15.01.2008

Unterschrift:..... 