

Aus der Abteilung für Transfusionsmedizin und Transplantationsimmunologie
der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums
Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. P. Kühnl

Einfluß von Kühlrate und Kryoprotektivzusammensetzung
auf die durchflußzytometrische Analyse von
Oberflächenantigenen kryokonservierter, peripherer
hämatopoetischer Progenitorzellen

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

CORINNA FELDMANN

aus Neumünster in Schleswig-Holstein

Hamburg 2002

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am 17. Februar 2003

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. C. Wagener

Referent: Prof. Dr. P. Kühnl

Korreferent: ---

INHALTSVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS	5
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	6
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	7
1 EINLEITUNG	10
1.1 Hämatopoetische Progenitorzellen	10
1.2 Zellseparation	15
1.3 Kryokonservierung.....	17
1.3.1 Methodik.....	18
1.3.2 Kryoprotektive	20
1.3.3 Kryokonservierung von Progenitorzellen.....	24
1.4 Durchflußzytometrie.....	24
1.4.1 Methodik.....	24
1.4.2 Analyse von Progenitorzellen.....	29
1.5 Oberflächenantigene.....	31
1.5.1 CD34	31
1.5.2 CD45	34
1.5.3 CD33	35
1.5.4 CD38	36
1.5.5 CD41a	37
1.5.6 CD _v 90	38
1.5.7 HLA-DR.....	39
1.6 Monoklonale Antikörper	40
1.7 Ziel der Untersuchungen.....	41

2 MATERIAL UND METHODEN	42
2.1 Untersuchungsmaterial	42
2.2 Kryokonservierung	44
2.2.1 Kryoprotektive Lösungen.....	44
2.2.2 Einfrierprotokolle	45
2.2.3 Einfriervorgang	45
2.2.4 Auftau- und Waschvorgang.....	46
2.3 Membranintegritätsbestimmung mit Trypanblau	48
2.4 Durchflußzytometrie.....	49
2.4.1 Probenvorbereitung.....	49
2.4.2 Inkubation mit monoklonalen Antikörpern.....	49
2.4.3 Erythrozytenlyse.....	51
2.4.4 Waschvorgang	51
2.4.5 Datenakquisition am Durchflußzytometer.....	51
2.4.6 Auswertung	52
2.4.7 Statistik.....	54
3 ERGEBNISSE	55
3.1 Zytapherese	55
3.2 Wiederfindungsrate.....	55
3.3 Membranintegritätsbestimmung.....	57
3.4 Durchflußzytometrische Analyse der Oberflächenantigene	60
3.4.1 CD33	60
3.4.2 CD38	62
3.4.3 CD41a	64
3.4.4 CD _w 90	66
3.4.5 HLA-DR	68
4 DISKUSSION	70

5 ZUSAMMENFASSUNG.....	76
6 ANHANG	78
7 LITERATURVERZEICHNIS	87
8 DANKSAGUNG	111
9 LEBENSLAUF	112
10 ERKLÄRUNG	113

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Epitopspezifitäten der CD34-Antikörper	33
Tab. 2: Patientendaten und Therapieschemata.....	43
Tab. 3: Kryoprotektive Lösungen.....	44
Tab. 4: Protokolle zur Kryokonservierung.....	45
Tab. 5: Kühlrate und Einfrierprotokoll / Gerät	46
Tab. 6: Zusammensetzung der Waschmedien	47
Tab. 7: Fluorochromfarbstoffe der verwendeten Antikörper	50
Tab. 8: Mittelwert und Standardabweichung der Wiederfindungsrate	56
Tab. 9: Mittelwert und Standardabweichung der Membranintegrität.....	58
Tab.10:Mittelwert und Standardabweichung der Wiederfindungsrate membranintakter Zellen.....	59
Tab. 11:Mittelwert und Standardabweichung CD33-positiver Zellen	61
Tab. 12:Mittelwert und Standardabweichung CD38-negativer Zellen.....	63
Tab. 13:Mittelwert und Standardabweichung CD41a-positiver Zellen	65
Tab. 14:Mittelwert und Standardabweichung CD _w 90-positiver Zellen	67
Tab. 15:Mittelwert und Standardabweichung HLA-DR-negativer Zellen.....	69
Tab. 16:Protokolle zur Kryokonservierung.....	78

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Das hämatopoetische System.....	13
Abb. 2: Emissionsspektren von Fluoreszenzfarbstoffen	27
Abb. 3: Prinzip des Zweiparameter-Punkthistogramms (dot plot).....	30
Abb. 4: Beispiel eines Zweiparameter-Punkthistogramms CD34 / CD45	53
Abb. 5: Wiederfindungsrate nach dem Auftau- und Waschvorgang	56
Abb. 6: Membranintegritätsbestimmung mit Trypanblau	57
Abb. 7: Wiederfindungsrate membranintakter Zellen.....	59
Abb. 8: CD33-positive Zellpopulation	60
Abb. 9: Beispiel eines Zweiparameter-Punkthistogramms CD33 / CD34	61
Abb. 10: CD38-negative Zellpopulation	62
Abb. 11: Beispiel eines Zweiparameter-Punkthistogramms CD38 / CD34	63
Abb. 12: CD41a-positive Zellpopulation	64
Abb. 13: Beispiel eines Zweiparameter-Punkthistogramms CD41a / CD34	65
Abb. 14: CD _w 90-positive Zellpopulation.....	66
Abb. 15: Beispiel eines Zweiparameter-Punkthistogramms CD _w 90 / CD34.....	67
Abb. 16: HLA-DR-negative Zellpopulation.....	68
Abb. 17: Beispiel eines Zweiparameter-Punkthistogramms HLA-DR / CD34 ...	69

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

7-AAD	7-Amino-Actinomycin
ACD	Acid-Citrat-Dextrose
ADP	Adenosindiphosphat
a PC	Phycocyanin
BFU-E	Burst forming units erythroid
CFU	Colony forming units
CFU-Baso	Colony forming units basophiles
CFU-Blast	Colony forming units blasts
CFU-G	Colony forming units granulocytes
CFU-GM	Colony forming units granulocytes-macrophages
CFU-GEMM	Colony forming units granulocytes-erythroid-macrophages-monocytes
CFU-Eo	Colony forming units eosinophiles
CFU-M	Colony forming units monocytes
CFU-Meg	Colony forming units megacaryocytes
CFU-Mix	Colony forming units mix
CD	Cluster of differentiation
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxiribonukleinsäure
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-macophage-colony stimulating factor
GP	Glykoprotein
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Forward scatter
HES	Hydroxyethylstärke

HPC	Hämatopoetische Progenitorzellen
HSA	Humanes Serumalbumin
IL-3	Interleukin 3
KP	Kryokonservierungs-Protokoll Nr.
Max	Maximum
M-CSF	Macophage-colony stimulating factor
Med	Median
Min	Minimum
MNC	mononuclear cell
Mw	Mittelwert
PBS	Phosphate buffered saline solution
PC	Phycocrythrin
PE	Phycoerythrin
PECy5	Phycoerythrin-Cyanid 5
PerCP	Peridin-Chlorophyll-a-Protein
PI	Propidiumjodid
SSC	Side scatter
Sw	Standardabweichung
Tx Red	Texas Red
vWF	von Willebrand Faktor

1 EINLEITUNG

1.1 Hämatopoetische Progenitorzellen

Hämatopoetische Progenitorzellen (HPC) besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Ausdifferenzierung und können aus Knochenmark, peripherem Blut, Nabelschnurblut und fetalen Leberzellen gewonnen werden. Nach Gewinnung der hämatopoetischen Progenitorzellen sind unterschiedliche Verfahren zur Reinigung (engl. purging), Isolierung, T-Zell-Depletion zur Risikominimierung einer Graft-versus-host-Reaktion und zur Anreicherung möglich. Eingesetzt werden diese Zellen für die Rekonstitution der Hämatopoese nach hochdosierter zytotoxischer Therapie. Auch zur Behandlung angeborener Stoffwechselerkrankungen bzw. im Zusammenhang mit gentherapeutischen Konzepten tun sich weitere Anwendungen auf. Zunehmend gewinnen weiterhin Methoden, wie z.B. die In-vitro-Expansion von hämatopoetischen Progenitorzellen, an Bedeutung.

Zum Verfahren der autologen peripheren Blutstammzelltherapie mit dem Ziel einer Rekonstitution der Hämatopoese gehören die Gewinnung peripherer Progenitorzellen mittels Zytapherese nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren, die Kryokonservierung der separierten Zellen, die Behandlung des Tumorpatienten mit einer potentiell kurativen, myeloablativen Hochdosis-Chemotherapie (oder Bestrahlung) und die Reinfusion der kryokonservierten peripheren hämatopoetischen Progenitorzellen. Im Gegensatz zur alleinigen Therapie mit Chemotherapeutika oder Bestrahlung bietet die Knochenmark- oder Blutstammzellgabe den Vorteil der Dosissteigerung der Chemotherapeutika, ungeachtet der Myelotoxizität, und dadurch eine Senkung der Morbidität und Mortalität der Patienten. Die Gewinnung peripherer Blutstammzellen erfolgt im autologen Fall vom Patienten selbst, im allogenen Konzept erfolgt die Gewinnung von einem möglichst HLA-identischen Spender.

Im Tierexperiment wurden einer Maus 1962 erstmals nach letaler Bestrahlung allogene periphere Blutzellen reinfundiert und dadurch eine hämatopoetische Rekonstitution erreicht (Goodman, 1962). Die Regeneration der Blutbildung nach Gabe von autologen kryokonservierten mononukleären Zellen, aus peripherem Blut mittels Apherese gewonnen, wurde 1977 von Nothdurft im Tierexperiment mit zuvor letal bestrahlten Hunden beschrieben (Nothdurft, 1977). Die erste erfolgreiche Reinfusion autologer, mittels Leukapherese gewonnener und kryokonservierter Blutstammzellen am Menschen erfolgte 1979 durch Goldman et al. bei 7 Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie während der Transformation zur akuten Phase (Goldman, 1979). Körbling et al. behandelten 1986 erstmalig einen an Burkitt-Lymphom erkrankten Patienten erfolgreich mit autologen, peripheren gewonnenen, nach Kryokonservierung aufgetauten hämatopoetischen Stammzellen (Körbling, 1986).

In den letzten Jahren hat das klinische Interesse an der Therapie mit autologen peripheren hämatopoetischen Progenitorzellen aufgrund der Vorteile im Vergleich zur Knochenmarkstammzelltherapie stetig zugenommen. Zum einen kann eine Reinfusion von peripheren hämatopoetischen Blutstammzellen auch bei tumorinfiltriertem oder strahlengeschädigtem Knochenmark oder bei Kontraindikationen für eine Knochenmarkpunktion durchgeführt werden. Bei einigen Erkrankungen wie dem Plasmozytom (Greipp, 1988) oder dem Non-Hodgkin-Lymphom (Sharp, 1991) scheint zudem die Tumorzellkontamination bei der Gewinnung peripherer hämatopoetischer Blutstammzellen geringer als bei der durch Knochenmarkpunktion zu sein. Zum anderen kommt die Gewinnung von peripheren Blutstammzellen ohne Narkose und ohne operativen Eingriff aus. Weiterhin führt die Reinfusion peripherer hämatopoetischer Blutstammzellen schneller zur Normalisierung der durch die Hochdosis-Chemotherapie supprimierten peripheren Blutzellen. So steigen die Thrombozytenkonzentration meist innerhalb von ca. 15 Tagen auf 20.000/ μ l nach Blutstammzellgabe. Bei einer Knochenmarkgabe werden gleiche Werte erst nach ca. 25 Tagen erreicht. Die Phase der Neutropenie wird ebenfalls reduziert. Durch diese verkürzte Neutro- und Thrombozytopeniezeit kommt es

zur Reduktion des Antibiotikabedarfs und zu einer Senkung des Verbrauchs an Blutprodukten.

So verkürzt sich beispielsweise der stationäre Krankenhausaufenthalt von 31 Tagen bei einer Knochenmarkstammzelltherapie auf 22 Tage nach einer Reinfusion mit hämatopoetischen Blutstammzellen (Lee, 1995). Insgesamt kommt es durch die oben genannten Fakten zu einer Kostenverringerung (Faucher, 1994). Die Gewinnung peripherer hämatopoetischer Blutstammzellen bietet also zahlreiche Vorteile gegenüber der Knochenmarktransplantation, so daß sich dieses Verfahren auch in den kommenden Jahren mehr und mehr durchsetzen wird (Inwards, 1992).

Zur Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark ins zirkulierende Blut werden dem Patienten oder dem Spender Zytokine, wie z.B. Interleukine oder Wachstumsfaktoren, systemisch appliziert. Zytokine sind Glykoproteine mit regulierender Wirkung auf die Kontrolle des Wachstums und der Differenzierung von Zellen. Zu den hämatopoetischen Wachstumsfaktoren gehören der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF), der Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (M-CSF), der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF). Von den bisher 12 bekannten Interleukinen, die als Regulatorproteine der Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von Zellen dienen, findet das Interleukin-3 (IL-3) für die Mobilisation Verwendung. Der Wachstumsfaktor M-CSF stimuliert die Bildung von Monozyten und Makrophagen, G-CSF die von Granulozyten. Granulozyten und Makrophagen werden auch durch die Faktoren GM-CSF und IL-3 in der Bildung gefördert (Platzer, 1989). G-CSF und GM-CSF binden an spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche und führen so zur intrazellulären Signaltransduktion (Link, 1995). In Abbildung 1 sind die einzelnen Zytokine mit entsprechenden Effektorzellen dargestellt.

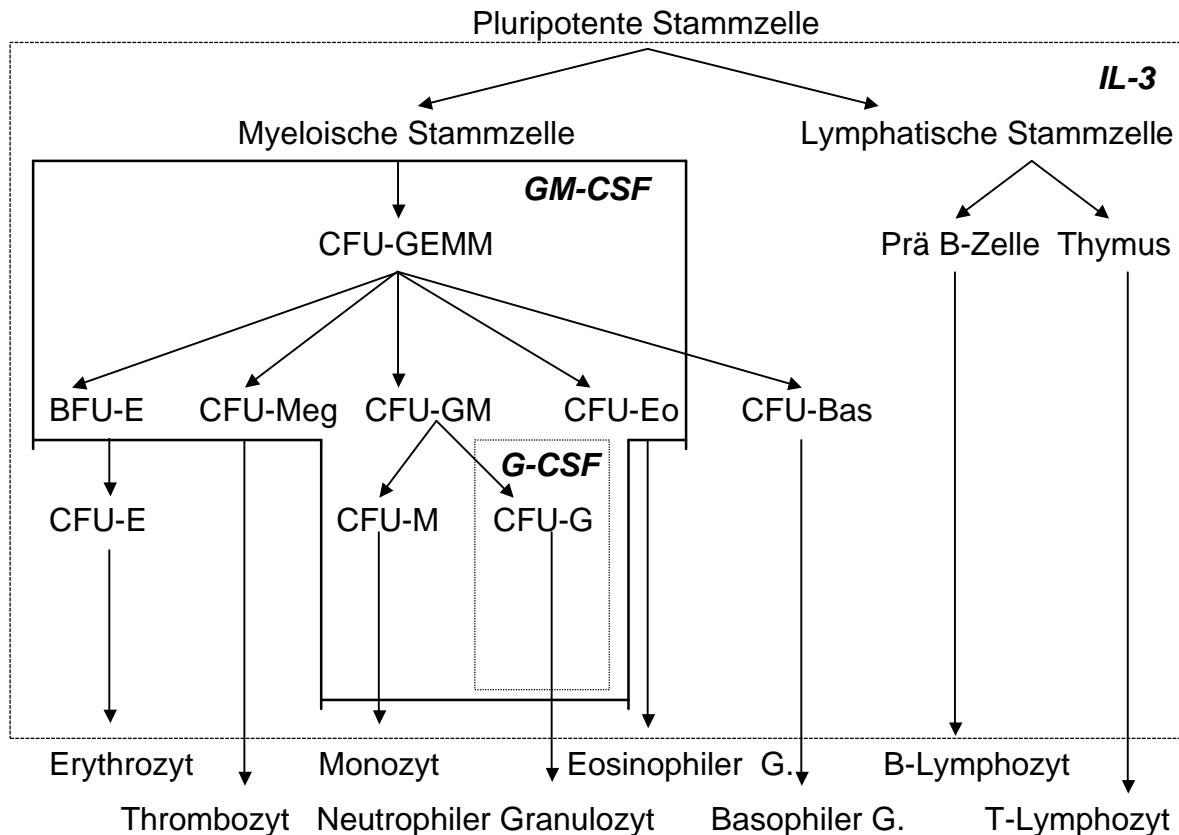


Abb. 1: Das hämatopoetische System

Schematische Darstellung der Entwicklung reifer hämatopoetischer Effektorzellen aus pluripotenten Stammzellen unter dem Einfluß von Wachstumsfaktoren und Interleukin (modifiziert nach Nathan, 1990; Sieff, 1987). Das jeweils in der rechten oberen Ecke aufgeführte Zytokin (fett, kursiv) beeinflusst die Entwicklung innerhalb des entsprechenden Kastens.

- IL-3: Interleukin-3
 G-CSF: Granulocyte-colony stimulating factor
 GM-CSF: Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor
 CFU-GEMM: determinierte Vorläuferzelle der Granulozyto-Erythrozyto-Monozyto-Megakaryozytopoese
 BFU-E: determinierte Vorläuferzelle der Erythrozytopoese
 CFU-Meg: determinierte Vorläuferzelle der Megakaryozytopoese
 CFU-GM: determinierte Vorläuferzelle der Granulozyto-Monozytopoese
 CFU-Eo: determinierte Vorläuferzelle der eosinophilen Granulozytopoese
 CFU-Baso: determinierte Vorläuferzelle der basophilen Granulozytopoese
 CFU-G: determinierte Vorläuferzelle der Granulozytopoese
 CFU-M: determinierte Vorläuferzelle der Monozytopoese

Indikationen zur Gabe von Wachstumsfaktoren sind kongenitale und chemotherapeutisch bedingte Neutropenien und die Mobilisierung hämatopoetischer Progenitorzellen ins periphere Blut (Link, 1995). Unerwünschte, jedoch reversible Wirkungen der Wachstumsfaktoren sind Fieber, Knochenschmerzen, Myalgien und Exantheme. Das häufig verwendete G-CSF wird üblicherweise in Dosierungen zwischen 1 x 5 µg/kg Körpergewicht und 2 x 12,5 µg/kg Körpergewicht eingesetzt. Verglichen mit der Gabe von 10 µg/kg Körpergewicht führt eine Applikation von 2 x 12 µg/kg Körpergewicht zu einem signifikantem Anstieg der CD34-positiven Zellen im Aphereseprodukt (Zander, 1996).

Die Mobilisation mit Wachstumsfaktoren bzw. Interleukin wird meist mit einer myeloablativen Hochdosis-Chemotherapie kombiniert oder im Anschluß daran vorgenommen. Die durch Chemotherapeutika bedingte Myelosuppression, die mit einer peripheren Neutro- und Thrombozytopenie einhergeht, bewirkt ein vermehrtes Ausschwemmen von Progenitorzellen aus dem Knochenmark ins zirkulierende Blut. Die maximale Mobilisierung nach Gabe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wird ungefähr nach 4-6 Tagen erreicht. Physiologisch beträgt die CD34-positive Zellkonzentration im peripheren Blut bei Erwachsenen weniger als 2×10^3 Zellen/ml, nach Mobilisation steigt die Zahl mindestens um das 5- bis 10-fache an (Sutherland, 1993; Siena, 1989).

Für die Rekonstitution der Hämatopoese nach myeloablativer Konditionierungstherapie sind üblicherweise ca. 2×10^6 CD34-positiv Zellen/kg Körpergewicht des Patienten notwendig (Lee, 1995). Diese Zahl ist jedoch in Abhängigkeit von der Diagnose und der geplanten Therapie starken Schwankungen unterworfen. Die Regeneration der Blutbildung vollzieht sich in einem Zeitraum von 2 bis 3 Wochen. Der optimale Zeitpunkt für die Gewinnung der peripheren Blutstammzellen ist individuell verschieden und kann orientierend durch die durchflußzytometrische Bestimmung CD34-positiver Zellen ermittelt werden (Bender, 1991).

Gesicherte Indikationen für die Therapie mit autologen peripheren hämatopoetischen Progenitorzellen sind hämatologische Erkrankungen wie das Multiples Myelom Stadium II-III (Beelen, 1998), das Non-Hodgkin-Lymphom und der Morbus Hodgkin. Kessinger et al. veröffentlichten 1991 eine Studie, in der 56 Patienten mit Morbus Hodgkin einer autologen peripheren Blutstammzellreinfusion unterzogen wurden. Die Wahrscheinlichkeit für ein rezidivfreies Überleben 3 Jahre nach Reinfusion betrug 37% (Kessinger, 1991). Therapien mit Progenitorzellen aus peripherem Blut bei soliden Tumoren wie Keimzelltumoren (z.B. Hodenkarzinom) sind bislang noch Gegenstand der Forschung. Die Behandlungsform ist nur geeignet für Tumorerkrankungen, die auf eine Chemotherapie ansprechen und mit anderen Maßnahmen nicht therapierbar sind. Zunächst schien beim prämenopausalen fortgeschrittenen und metastasierten Mammakarzinom ein eindeutiger Vorteil der Hochdosis-Chemotherapie gegenüber der Standarddosistherapie zu zeigen, die zugrunde liegende Studie (Bezwoda, 1995) erwies sich jedoch als gefälscht (Richer, 2000).

1.2 Zellseparation

Die Hämapherese ist ein Verfahren zur Gewinnung einzelner Blutkomponenten durch den Einsatz von Zellseparatoren mittels eines extrakorporalen Kreislaufs. Anwendung findet dieses Verfahren hauptsächlich für die Herstellung von Thrombozytenkonzentraten und gerinnungsaktiven Plasmen sowie zur Gewinnung peripherer Blutstammzellprodukte. In Studien von Juttner et al. und Körbling et al. wurde die Leukapherese erstmals Mitte der 80er Jahre zur Gewinnung humaner hämatopoetischer Progenitorzellen aus peripherem Blut erfolgreich eingesetzt (Juttner, 1985; Körbling, 1986).

Bei diesem Verfahren wird die Fraktionierung des Blutes durch Zentrifugation während der Spende erreicht. Die jeweils nicht benötigten Komponenten des Blutes, z.B. bei der Stammzellgewinnung das Plasma und die Erythrozyten bzw. Thrombozyten, werden - mit geringen Verlusten - dem Patienten wieder zugeführt. Die Entnahme erfolgt unter sterilen Kautelen entweder über einen peripheren Zugang (z.B. vena mediana cubiti) oder über einen zentralen Venenkatheter (z.B. vena jugularis, vena subclavia) und unter Beibehaltung eines möglichst geschlossenen Systems, um mikrobielle Kontaminationen zu vermeiden.

Periphere Blutstammzellen ähneln morphologisch den Lymphozyten des Blutes und sedimentieren bei der Zentrifugation im Bereich der mononukleären Zellen (mononuclear cells = MNC) (Mueller-Eckhardt, 1996). Für ihre Gewinnung wird üblicherweise ein zwei- bis dreifaches Blutvolumen (bis zu 20 Liter) innerhalb von 2 bis 5 Stunden prozessiert. Das Produktvolumen beträgt zwischen 50 und mehreren hundert ml. Bei geringen Ausbeuten CD34-positiver Zellen wird die Apherese an bis zu 5 aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt (Lee, 1995). Zusätzlich zum Antikoagulant ACD-A wird gelegentlich auch Heparin während der Leukapherese zur Gerinnungshemmung eingesetzt.

Qualitätskontrollen der Stammzellapheresate beinhalten u.a. die Bestimmung der mononukleären Zellzahl im Differentialblutbild, die Durchführung eines klonogenen Kulturassays mit quantitativer Bestimmung der Zellkolonien, die Membranintegritätsbestimmung (z.B. mit Trypanblau) und die durchflußzytometrische Quantifizierung der CD34-positiven Zellen. Zum Ausschluß einer mikrobiellen Kontamination ist ein Sterilitätsnachweis gefordert.

1.3 Kryokonservierung

Im Jahre 1948 gelang erstmalig die Kryokonservierung lebender biologischer Zellen. Polge et. al. fanden heraus, daß durch Zusatz von Glycerin Spermatozoen vor schädlichen Einflüssen während des Einfrierens und Auftauens geschützt werden (Polge, 1949). Ähnliche Effekte entdeckte Smith bei der Kryokonservierung von Erythrozyten im Jahr 1950 (Smith, 1950). Ein Jahr später setzte Sloviter nach dem Auftauen ein Dialyseverfahren zur Entfernung des Glycerins ein und ermöglichte somit die Transfusion kryokonservierter Erythrozyten (Sloviter, 1951). Die erste erfolgreiche Transfusion kryokonservierter Erythrozyten am Menschen wurde 1951 von Mollison vorgenommen (Mollison, 1951). Im Tierexperiment wurde 1955 eine Reinfusion von kryokonservierten Knochenmarkstammzellen durch Barnes und Loutit durchgeführt (Barnes, 1955). Lymphozyten wurden 1962 von Atkins mit Glycerin kryokonserviert (Atkins, 1962).

Die kryoprotektive Wirkung des Gefrierschutzadditivs Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde bereits 1959 von Lovelock und Bishop entdeckt (Lovelock, 1959). Bereits 2 Jahre später setzte Ashwood-Smith DMSO zur Kryokonservierung von Knochenmarkstammzellen ein (Ashwood-Smith, 1961). Weitere 5 Jahre später erfolgte durch Djerassi et al. das Tiefgefrieren von Thrombozyten mit DMSO (Djerassi, 1966). Um unerwünschte Nebenwirkungen des Kryoprotektivs DMSO zu vermeiden, wurde von Lundberg et al. ein Waschschrift zur Entfernung des DMSO vor der Transplantation von Knochenmarkstammzellen eingeführt (Lundberg, 1967). Hydroxyethylstärke (HES) fand in Kombination mit DMSO 1983 den Einzug in die Kryokonservierung (Stiff, 1983). Stiff et al. untersuchten eine Kombination aus 5% DMSO und 6% HES im Vergleich zum Protokoll mit 10% DMSO für die Kryokonservierung von Knochenmarkstammzellen. Allerdings war bereits 1975 HES als geeignetes Kryoprotektiv für Stammzellen beschrieben worden (Schaefer, 1975).

1.3.1 Methodik

Verschiedene Faktoren beeinflussen die Zellen während der Kryokonservierung, wozu auch der anschließende Auftau- und ggf. ein Waschvorgang gehören. Außer der Temperaturführung beim Abkühlen und Auftauen und der Lagerungstemperatur zählt dazu die Zusammensetzung des umgebenden Mediums, welche vor allem durch die Verwendung von Kryoprotektiven modifiziert werden kann.

Beim Gefrieren von biologischen Zellsuspensionen hat die Lagerungstemperatur selbst einen eher geringen Einfluß. Für eine zeitlich unbegrenzte Lagerung sollte sie allerdings unterhalb der Glasübergangstemperatur für reines Wasser (-138°C) liegen. Unterhalb dieser Temperatur sind die Umstände, die für das Entstehen und das Wachsen von Eiskristallen nötig sind, nicht mehr gegeben. Dagegen spielen die Vorgänge während des Einfrierens und des Auftauens, insbesondere der transmembranöse Wassertransport, für eine mögliche Schädigung der Zellen eine große Rolle. Diese Vorgänge sollen anhand eines Modells schematisch erläutert werden: In diesem Modell, welches schon an anderer Stelle beschrieben wurde (Sputtek, 1996), ist der Extrazellulärraum der Zellsuspension einer wäßrigen Lösung von Natriumchlorid in Wasser gleichgesetzt. Der Intrazellulärraum läßt sich in ein osmotisch aktives Volumen und ein osmotisch inaktives Restvolumen einteilen. Die Zellmembran zwischen Intra- und Extrazellulärraum ist semipermeabel, das heißt für Wasser durchlässig und nahezu undurchdringlich für Elektrolyte. Beim Absinken der Temperatur unter die Friertemperatur des Extrazellulärraums kommt es zur Bildung von extrazellulären Eiskristallen. Dadurch entsteht ein osmotisches Ungleichgewicht, da die Elektrolyte nicht in die Eiskristalle eingebaut werden. In der verbleibenden Restlösung erfolgt eine Aufkonzentrierung, was einen Wasseraustritt aus den Zellen und eine Schrumpfung der Zellen zur Folge hat. Dieser Vorgang läuft bis zum Erreichen des eutektischen Punktes ab, welcher

für eine wässrige Natriumchloridlösung durch eine Salzkonzentration von 23,3 Gew.-% und eine Temperatur von 21,2°C charakterisiert ist. Unterhalb des eutektischen Punkt erstarrt die Lösung vollständig. Die oben genannte hohe Elektrolytkonzentration schädigt die Zellen durch Wasserabgabe entlang des osmotischen Gradienten, um das Konzentrationsgefälle zwischen Intra- und Extrazellulärraum auszugleichen. Diese Entwässerung (osmotische Dehydrierung) strebt das Erreichen des inaktiven Restvolumen an und schädigt die Zellen bereits unterhalb eines kritischen Restvolumens irreversibel. Dieses kritische Restvolumen ist für verschiedene Zellarten unterschiedlich. Diese Zusammenhänge zwischen Temperatur und der Zellschädigung wurde erstmalig von Lovelock (Lovelock, 1953) bei Erythrozyten beschrieben. Er konnte zeigen, daß nicht die mechanische Eiskristallbildung, sondern der Anstieg der Elektrolytkonzentration im Extrazellulärraum die Schädigung der Zellen verursacht.

Die Kinetik der Temperaturabsenkung beeinflusst neben der Membranpermeabilität maßgeblich die Überlebensrate von biologischen Zellen während des Einfrieren und Auftauens. Bei schneller Temperaturabsenkung pro Zeit, d.h. hoher Kühlrate (K/min), können die Zellen nur wenig Wasser nach außen abgeben. Aufgrund des verbleibenden relativ hohen Restwassergehaltes kommt es dann beim Erreichen tieferer Temperaturen zur meist letalen intrazellulären Eiskristallbildung. Das Zusammenspiel dieser schädigenden Einflüsse wurde von Mazur in der 2-Faktoren-Hypothese zusammengefaßt (Mazur, 1972). Mazur beschreibt die beiden Vorgänge als gegenläufige Prozesse, die je nach Zellart eine optimale Kühlrate ergeben. Bei langsamem Abkühlen entsteht intrazellulär eine hohe Elektrolytkonzentration, die zur Zellschädigung führt („Lösungseffekt“). Dagegen ist die intrazelluläre Eiskristallisation Folge einer zu hohen Kühlrate. Aus der Kombination der beiden Vorgänge resultiert eine für jede Zelle spezifische optimale Kühlrate. Das Optimum der Kühlrate ist u.a. abhängig vom Zellvolumen, der Oberflächenstruktur und der Membranpermeabilität der Zelle.

Die Zugabe von Kryoprotektiven verändert zellspezifisch die Überlebensrate. Durch Kryoprotektive verschiebt sich die optimale Kühlrate zu niedrigeren Werten. Leibo et al. konnten 1970 eine Abhängigkeit der Konzentration des Kryoprotektivs und der Kühlrate auf die Überlebensrate der Zellen während der Kryokonservierung von Knochenmarkstammzellen nachweisen (Leibo, 1970). Mit zunehmender Glycerinkonzentration steigt die Überlebensrate der Zellen, und die optimale Kühlrate verschiebt sich zu niedrigeren Werten. So war bei gleicher Kühlrate die Wiederfindungsrate von murinen Knochenmarkstammzellen bei einer 1,25 molaren höher als bei 0,4 molaren Glycerinkonzentration (Leibo, 1971). Die höchste Überlebensrate wurde bei einer Kühlrate von 1,5 K/min und einer 1,25 molaren Glycerinkonzentration gefunden (Leibo, 1970).

1.3.2 Kryoprotektive

Kryoprotektive Substanzen werden häufig in niedermolekulare Gefrierschutzadditive, wie z.B. DMSO (Brayton, 1986) bzw. Glycerin, und makromolekulare Kryoprotektive eingeteilt. Additive mit niedrigem Molekulargewicht sind i.d.R. in der Lage, Zellmembranen zu penetrieren, wirken daher intra- und extrazellulär. Sie erniedrigen konzentrationsabhängig die Gleichgewichtsfriertemperatur durch ihre kolligativen Eigenschaften. Dadurch kommt es erst bei niedrigeren Temperaturen zum Anstieg der schädigenden Elektrolytkonzentration im Extrazellulärraum. Durch Penetration in die Zellen bewirken niedermolekulare Additive intrazellulär eine glasartige Erstarrung, auch Vitrifikation genannt, und vermindern eine mögliche intrazelluläre letale Eiskristallisation. Die makromolekularen Gefrierschutz-additive wie Dextrane, Gelatine und Hydroxyethylstärken (HES) können die Zellmembranen nicht permeieren und wirken ausschließlich extrazellulär.

1.3.2.1 Dimethylsulfoxid

DMSO ist eine farb- und geruchslose Flüssigkeit und hat ein Molekulargewicht von 78,13 g/mol. Die Dosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben (= LD₅₀), beträgt je nach Spezies zwischen 2,5 und 9,2 g/kg Körpergewicht (Willhite, 1984).

Klinische Anwendung findet das Gefrierschutzadditiv DMSO in der Kryokonservierung von Stammzellprodukten, Thrombozyten und Lymphozyten. Aufgrund der Histaminfreisetzung und Anticholinesterase-Aktivität (Brayton, 1986) kommt es zu unerwünschten Wirkungen wie Hautreaktionen, Vasodilatation, Schwindel und Erbrechen. Weiterhin wirkt DMSO antiphlogistisch, analgetisch und diuretisch (Jacob, 1986). Stiff et al. untersuchten Patienten nach autologer, mit einer Kombination aus DMSO- und HES-kryokonservierter Knochenmarkstammzellreinfusion. Ungefähr jeder Fünfte (21%) empfand ein ca. 5 min andauerndes substernales Engegefühl, 14% klagten über ein Schwindelgefühl und Erbrechen. In 8,3% der Fälle kam es zu einem Anstieg der Körpertemperatur auf 38°C und bei einem Patienten von 60 trat Juckreiz auf (Stiff, 1987). Während der Reinfusion des Stammzellpräparates wird häufig ein knoblauchähnlicher Geschmack aufgrund der DMSO-Metabolisierung bemerkt (Rowley, 1992). Auch anaphylaktoide Reaktionen und akutes Nierenversagen sind als seltene, jedoch schwerwiegende unerwünschte Wirkungen beschrieben worden (Smith, 1987). Diese Beobachtungen beziehen sich allerdings überwiegend auf Präparationen von Knochenmarkstammzellen, die in wesentlich größeren Volumina als die heutzutage üblichen peripheren Blutstammzellpräparate verabreicht wurden. Das Vermischen des Gefrierschutzadditivs DMSO mit Wasser führt zu einer exothermen Reaktion, deshalb sollte es bereits vorverdünnt bei 4°C portionsweise zum vorgekühlten Stammzellpräparat gegeben werden. Die Zugabe der DMSO-haltigen Lösung sollte langsam und unter ständiger Durchmischung erfolgen, um das osmotisches Ungleichgewicht zwischen Intra-

und Extrazellulärraum zu minimieren und eine kontinuierliche Diffusion des DMSO durch die Zellmembran in das Zellinnere zu ermöglichen.

Eine Konzentrierung der mononukleären Zellen (Rowley, 1994; Keung, 1996) durch Dichtegradienten-Zentrifugation nach der Gewinnung von Knochenmarkstammzellen führt zu einer Reduzierung der DMSO-Konzentration und somit zur Minimierung der oben genannten unerwünschten Wirkungen. Weiterhin wurde erstmalig durch die Einführung eines Waschschrilles nach dem Auftauen kryokonservierter Thrombozytenprodukte die Menge des infundierten Additivs verringert (Lundberg, 1967). Eine Medikation mit H₁-Antihistaminika (z.B. Diphenylhydramin, Clemastin), Kortikosteroiden und osmotisch wirksamen Pharmaka (z.B. Mannitol) reduziert eventuell auftretende Unverträglichkeitsreaktionen (Davis, 1990).

1.3.2.2 Hydroxyethylstärke

Das Kryoprotektiv Hydroxyethylstärke (HES) besteht hauptsächlich aus dem hochverzweigten Polysaccharid Amylopektin (Wachsmaisstärke). Es handelt sich bei verschiedenen HES um eine heterogene Gruppe von Molekülen, die sich in der Anzahl der hydroxyethylierten Gruppen innerhalb des Moleküls und der Molekülgröße selbst unterscheiden. Die kryoprotektive Wirkung von HES wurde erstmalig 1967 von Knorpp et al. für Erythrozyten beschrieben (Knorpp, 1967). Der genaue Wirkungsmechanismus ist bislang nicht genau erforscht. Eine Erklärung der Wirkungsweise des Additivs lieferten Körber et al. 1982 durch den Nachweis der Wasserbindungskapazität von HES: 1 g HES ist in der Lage, 0,5 g Wasser zu binden und verringert so das Ausmaß der Eisbildung (Körber, 1982). Takahashi postulierte 1988 eine durch Erniedrigung der Temperatur entstehende schützende visköse Hülle der hydroxylierten Stärke um die Zellen (Takahashi, 1988). Der Abbau des Gefrierschutzadditivs erfolgt über α -Amylase (Anstieg der α -Amylase im Plasma) und durch intrazelluläre

Spaltung von HES in den Lysosomen. Kleinere HES-Moleküle werden direkt, größere HES-Moleküle erst nach der oben erwähnten hydrolytischen Spaltung renal (70-80%) ausgeschieden (Mishler, 1982).

Aufgrund der Fähigkeit zur Wasserbindung wird HES aber neben der Anwendung als Kryoprotektiv vor allem als Plasmaexpander eingesetzt. Klinische Indikationen für die Gabe als Plasmaexpander sind zum einen durch Blutung oder Schock bedingte Hypovolämie und zum anderen eine Verbesserung der Mikrozirkulation bei arterieller Verschlusskrankheit durch Hämodilution. Unerwünschte Wirkungen, wie Juckreiz, Tachykardie, anaphylaktoide Reaktionen (Mishler, 1982) mit Exanthenen und Symptomatik bis zum Schock (Richter, 1983; Laxenaire, 1994), Beeinflussung der Serumamylase und akutes Nierenversagen, treten mit 0,007 - 2,6% insgesamt selten auf.

1.3.3 Kryokonservierung von Progenitorzellen

Für die klinische Anwendung erfolgt die Kryokonservierung peripherer hämatopoetischer Progenitorzellen meist mit dem Kryoprotektiv DMSO allein oder in einer Kombination aus DMSO und HES. Ein weit verbreitetes Verfahren beinhaltet die Verwendung von 10% DMSO, einer Kühlrate von 1,5 K/min und Lagerung in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff bei unter -160°C . Alternativ wird bisweilen ein Protokoll mit 5% DMSO und 6% HES bei einer Kühlrate von 5 K/min und kurzfristiger Lagerung in einem -80°C kalten Tiefkühlgerät eingesetzt. Untersuchungen mit diesem „Alternativprotokoll“, welches technisch einfacher und kostengünstiger durchzuführen ist, ergaben gute zahlenmäßige Wiederfindungsraten der kryokonservierten Stammzellen ($92,0 \pm 3,5\%$) und klinisch eine vergleichbare hämatologische Rekonstitution (Makino, 1991). Beim Vergleich des kontrollierten Einfrierens (mikroprozessorgesteuertes Gerät) mit unkontrolliertem Abkühlen (-70°C -Kühlschrank) konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der CFU-GM-Wiederfindungsrate nachgewiesen werden (Clark, 1991).

1.4 Durchflußzytometrie

1.4.1 Methodik

Das Prinzip der Durchflußzytometrie (fluorescence activated cell sorting = FACS) besteht in der Anregung von Partikeln oder Zellen in einem Flüssigkeitsstrahl durch einen im rechten Winkel zum Flüssigkeitsstrahl auftreffenden Laserstrahl, dessen Licht detektiert und quantifiziert wird. Ein Durchflußzytometer kann bis zu 5000 Zellen pro Sekunde analysieren und simultan verschiedene physikalische und chemische Eigenschaften der Zellen

erfassen. Es wird vor allem für die Bestimmung von verschiedenen Oberflächenantigenen zur Charakterisierung einzelner Zellreihen eingesetzt. Mit der Durchflußzytometrie können alle Arten von biologischen Zellen, u.a. auch Thrombozyten, Erythrozyten, Leukozyten und Stammzellen untersucht werden. Die Messung von hämatopoetischen Progenitorzellen kann zur Qualitätskontrolle von Zytapherese- oder Knochenmark- bzw. Nabelschnurprodukten eingesetzt werden.

Ein FACS-Gerät besteht i.d.R. aus einem Flüssigkeitssystem, einem optischen Meßsystem, einem elektronischen System für die Signalverarbeitung und einem Datenverarbeitungsprogramm. Im Flüssigkeitssystem wird eine Zellsuspension mit einer Konzentration von etwa 10^6 Zellen/ml durch Überdruck über eine Stahlkapillare in eine aus Quarzglas bestehende Meßküvette geleitet. Eine Trägerflüssigkeit umhüllt die Zellsuspension, und bei einer geeigneten Fließgeschwindigkeit wird ein laminarer Fluß aufgebaut.

Diese „hydrodynamische Fokussierung“ bewirkt, daß die Zellen einzeln und rasch hintereinander die Lichtquelle passieren (Raffael, 1988) und so getrennt voneinander detektiert werden können. Wichtige Parameter des Flüssigkeitssystems sind der Durchmesser des Flüssigkeitsstroms, der die Anzahl der zu analysierenden Zellen limitiert, die Trägerflüssigkeitsrate, welche die Flußgeschwindigkeit determiniert, und die Flußrate der Probensuspension, die in Abhängigkeit von der Zellkonzentration die Zellanalyserate bestimmt (Recktenwald, 1993).

Als Lichtquelle dient ein Argon-Ionenlaser, der monochromatisches, gerichtetes Licht der Wellenlänge 488 nm emittiert. Dieses Emissionsspektrum liegt im Absorptionsbereich der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe. Der Laser, der mit ca. 0,5 W Strom ionisiert wird, trifft senkrecht auf den Probenstrom. Fokussiert der Laser eine einzelne Zelle, entstehen charakteristische Lichtstreuungs- und Fluoreszenzeffekte. Anhand unterschiedlicher Lichtstreuungseigenschaften können Zellpopulationen in morphologisch verschiedene Klassen eingeteilt

werden. Die Analyse von unfixierten, ungefärbten Leukozyten erlaubt die Einteilung in Lympho-, Mono- und Granulozyten (Salzman, 1975). Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter = FSC) korreliert über die Messung der Querschnittsfläche mit der Größe der Zellen (Mullaney, 1969; Steinkamp, 1973). Die Granularität der Zellen wird mit dem Seitwärtsstreulicht (side scatter = SSC) erfaßt.

Zur Immunphänotypisierung der zu untersuchenden Zellen stehen zusätzlich verschiedene Fluorochrome zur Verfügung. Bis zu drei Fluorochrome können simultan eingesetzt werden (Terstappen, 1988). Fluorochrome sind Fluoreszenzfarbstoffe, die eine Reaktion zwischen zugesetztem Reagens und Zellkomponenten, z.B. Oberflächenantigenen, sichtbar machen. Zum einen existieren Farbstoffe, die eine spezifische Affinität zu bestimmten Zellstrukturen haben. So markiert beispielsweise Propidiumjodid (PI) die Desoxiribonukleinsäure (DNS) des Zellkerns bei Zellen mit defekter oder lysierter Zellmembran nach Denaturierung der DNS mit roter Fluoreszenz.

Zum anderen können Fluoreszenzfarbstoffe an monoklonale Antikörper konjugiert werden, die spezifisch an die Oberflächenantigene der Zelle binden. Wichtige Eigenschaften eines Fluoreszenzfarbstoffes für die durchflußzytometrische Analyse sind das Absorptionsspektrum und das Fluoreszenzemissionsspektrum. Häufig verwendete Fluorochromfarbstoffe sind Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) mit Emissionsmaxima von 525 nm bzw. 578 nm. Das Emissionsspektrum von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, die von Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt werden können, ist in Abbildung 2 dargestellt. Im Vergleich zu FITC zeigt PE häufiger unspezifische Bindungen und hat eine stärkere Fluoreszenzintensität. Für schwach exprimierte Antigenstrukturen empfiehlt sich deshalb der Einsatz von PE als Fluoreszenzfarbstoff. Durch die Markierung von Oberflächenantigenen wird eine Erfassung und Darstellung einer einzelnen Zellpopulation und die Berechnung des prozentualen Anteils dieser Population an der Gesamtzellzahl möglich.

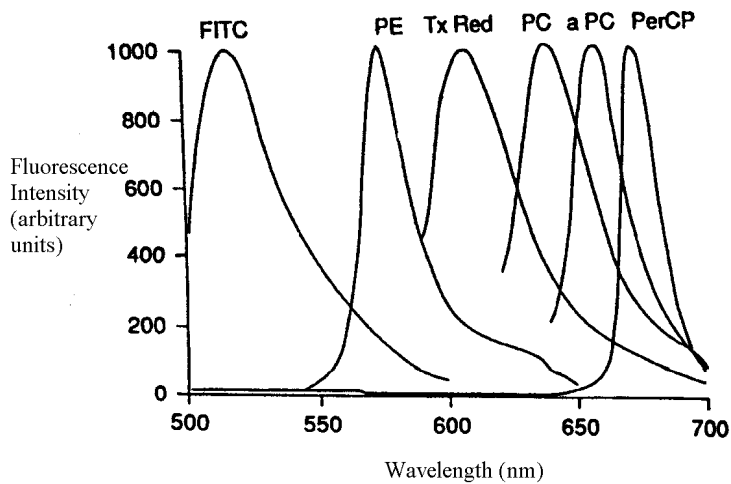


Abb. 2: Emissionsspektren von Fluoreszenzfarbstoffen

Fluoreszenzspektren von Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Texas Red (Tx Red), Phycocrythrin (PC), Phycocyanin (a PC) und Peridin-Chlorophyll-a-Protein (PerCP) (nach Raffael, 1988).

Zum Ausgleich einer Emissionsspektrenüberlappung dient die Kompensation der Fluorochromfarbstoffe. Sie erfolgt bei der Mehrfarbenfluoreszenz durch Subtraktion von Rotstrahlung im Grünbereich und umgekehrt (Raffael, 1988).

Die fluoreszenzmarkierten Zellen werden durch den Argonlaser angeregt. Die fluoreszierenden Verbindungen absorbieren die Lichtenergie, und diese Energie hebt die Elektronen des Fluorochroms auf ein höheres Energieniveau. Beim Rücksprung der Elektronen auf ihren Energiegrundzustand emittieren sie ein Photon. Dieses Photon wird in Form von Lichtenergie (Emissionsspektrum) frei, welche energieärmer und langwelliger als das Anregungslicht ist.

Die Lichtsignale werden über ein optisches System zu Meßdetektoren geleitet. Das optische System besteht aus einem Anregungsteil, der für die Strahlenformung des Laserlichtes zuständig ist, und aus einem Detektionsteil für das Vorwärtsstreulicht und einen zweiten für das Seitwärtsstreulicht und das Fluoreszenzlicht. Das Licht wird gebündelt, und Detektoren wandeln die

Lichtsignale mit Hilfe von vier Photoröhren und einer Photodiode in elektrische Signale um. Die Photodiode (engl. photomultiplier) ist ein Detektor mit geringer Lichtempfindlichkeit und wird zur Messung intensiver Lichtsignale, z.B. Vorwärtsstreulicht, verwendet. Photoröhren dagegen können schwache Lichtsignale verstärken und finden in der Verstärkung der schwächeren Fluoreszenz- und Seitwärtsstreulichtsignale Verwendung.

Es gibt zwei Arten der Signalverstärkung. Für die schwachen Fluoreszenzsignale der Fluorochromfarbstoffe wird meist eine logarithmische Verstärkung verwendet, während Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht linear amplifiziert werden (Recktenwald, 1993). Die Signale werden je nach Auflösung des Analog-Digital-Wandlers in 256 bzw. 1024 Kanäle umgewandelt. Mittels Schwellenwerteneinstellung (engl. threshold) können Zellaggregationen und Zelltrümmer ausgegrenzt werden und Rausch- und Störsignale ausgeblendet werden. Damit verbessert sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis.

Für die Auswertung stehen leistungsfähige Computersysteme zur Verfügung. Eine häufige Darstellung der akquirierten Daten ist die Häufigkeits- oder Histogrammverteilung. Bei der Zweiparameterdarstellung eignet sich die Darstellung im Punkthistogramm (dot plot). Ein Histogramm ist die Darstellung eines untersuchten Parameters in Bezug zur Intensität für ein vorgegebenes Intensitätsintervall. Die simultane Darstellung zweier Parameter ist im Punkthistogramm möglich. Jeder Punkt des Dot-plot-Diagramms steht für eine gemessene Zelle. Im Vergleich beider Diagramme stellt das Punkthistogramm deutlicher die einzelnen Zellpopulationen dar und ermöglicht dadurch eine bessere Diskriminierung zwischen verschiedenen Zelltypen. Die Beschränkung auf bestimmte Daten einer Untersuchung kann mittels Auswertefenstern (engl. gate) erfolgen. Durch das Definieren von Auswertefenstern kann die darzustellende Zellpopulation von Aggregaten, Zelltrümmern und anderen Zellpopulationen abgegrenzt werden und einzelne Parameter können gesondert dargestellt werden. Somit kann eine Klassifizierung verschiedener Parameter aus einem komplexen Zellgemisch erreicht werden, aber ebenso ist auch die Darstellung verschwindend geringer Subpopulationen möglich.

1.4.2 Analyse von Progenitorzellen

Die Charakterisierung und Quantifizierung CD34-positiver hämatopoetischer Progenitorzellen kann mittels Multiparameter-Durchflußzytometrie erfolgen. Dabei lassen sich neben dem CD34-Antigen und der Koexpression von bis zu zwei Differenzierungsantigenen gleichzeitig auch die Streulichteigenschaften simultan untersuchen und damit die Progenitorzellen differenzieren.

Als Probenmaterial für die Analyse CD34-positiver Zellen eignet sich Vollblut, Knochenmark, Nabelschnurblut oder ein Aliquot aus der Zytapherese, das unter sterilen Bedingungen gewonnen wurde. Die Entnahme des Probenmaterials, die Lagerung und Weiterverarbeitung sollte standardisiert und dokumentiert werden. Wichtige Einflußfaktoren, wie Zeitpunkt der Entnahme, Medikation des Patienten, Diagnose und andere individuelle Bedingungen müssen protokolliert sein. Die maximale Lagerungszeit der Proben bis zur Messung beträgt 6 Stunden.

Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen zeigen ähnliche Lichtbrechungseigenschaften wie Lymphozyten des peripheren Blutes durch ihre morphologische Ähnlichkeit in der durchflußzytometrischen Analyse. Durch ihre Größe, sie sind nur geringfügig größer als Lymphozyten (Civin, 1987), ist eine Differenzierung zu Monozyten und Granulozyten möglich (Loken, 1990). Vor der Analyse müssen die Erythrozyten durch Lyse und Zentrifugation von der Zellsuspension getrennt werden, da die Erythrozyten die Messung störend beeinflussen (Liu, 1989).

Eine typische Verteilung eines durchflußzytometrisch analysierten Leukaphereseproduktes zeigt Abbildung 3 (eigene Messung) in einem zweidimensionalen Punkthistogramm.

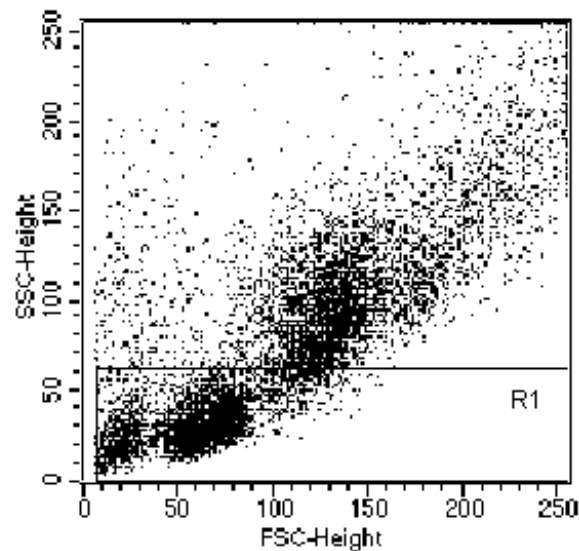


Abb. 3: Prinzip des Zweiparameter-Punkthistogramms (dot plot)

Zytaphereseprodukt nach Mobilisierung mit G-CSF, Kryokonservierung mit 10% DMSO und einer Kühlrate von 1,5 K/min, Auftauen im 37°C Wasserbad, Markierung mit monoklonalen Antikörpern, Erythrozytenlyse, Akquisition im FACS-Gerät:

Zweiparameter-Punkthistogrammdarstellung (jeder dargestellte Punkt entspricht dem Meßwert von mindestens einer Zelle). Korrelationsdarstellung der Parameter FSC (x-Achse, linear) und SSC (y-Achse, linear): Erfassung aller Zellen des Zytaphereseproduktes. Die Punktwolken repräsentieren die einzelnen Zellarten (Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten). Die Region R1 beinhaltet die peripheren hämatopoetischen Progenitorzellen, die im Bereich der mononukleären lymphozytären Zellpopulation angesiedelt sind.

1.5 Oberflächenantigene

Eine Zelle kann durch die Expression ihrer Oberflächenantigene charakterisiert werden. Im Laufe der Zelldifferenzierung verändert sich die Expression der Antigene, und die Linienzugehörigkeit einer Zelle kann mit einem entsprechenden Antikörper durchflußzytometrisch analysiert werden. Die Oberflächenantigene werden zu sogenannten cluster of differentiation (CD) zusammengefaßt.

1.5.1 CD34

Das CD34-Antigen ist ein stark glykosyliertes Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 115 kDa (Sutherland, 1992a). Es ist auf dem langen Arm des Chromosoms 1q codiert (Molgaard, 1989) und wird von hämatopoetischen Vorläuferzellen und allen Zellen kolonie-bildender Einheiten (colony forming units = CFU) des Knochenmarks und des peripheren Blutes, unipotente und pluripotente Vorläuferzellen eingeschlossen, sowie von Endothelzellen exprimiert. Zu den unipotenten Vorläuferzellen zählen burst forming units erythroid (BFU-E), colony forming units granulocytes-macrophages (CFU-GM), zu den pluripotenten Zellen colony forming units granulocytes-erythroid-macrophages-monocytes (CFU-GEMM), colony forming units mix (CFU-Mix) und colony forming units blasts (CFU-Blast). Pluripotenten Zellen fehlt im Gegensatz zu Stammzellen die Fähigkeit zur Selbstreplikation auf identischem Differenzierungsniveau.

Auf etwa 1% bis 4% der mononukleären Zellen im Knochenmark und 0,2% der mononukleären Zellen des peripheren Blutes ist das Glykoprotein CD34 nachweisbar (Bender, 1991). Die Gewinnung CD34-positiver Knochenmarkstammzellen wird erfolgreich für die hämatopoetische Rekonstitution nach

myeloablativer Hochdosis-Chemotherapie eingesetzt (Berenson, 1991). Eine frühe, unreife CD34-positive Vorläuferpopulation zeichnet sich durch fehlende Koexpression linienzugehöriger Antigene aus. Weiterhin ist diese Population charakterisiert durch negative oder lediglich schwach positive HLA-DR-Expression, positive CD_w90-Expression und Expression von CD45R0 (engl. R = restricted; 0 = CD45-Isoform ohne Sequenz der Exons A, B und C). Ebenso sind diese Zellen meist CD38-negativ (Terstappen, 1991). Das CD34-Antigen findet sich auf frühen myeloischen Zellen, die das Antigen CD33 exprimieren und CD14- und CD15-negativ sind, und ist auf frühen erythrozytären Zellen mit CD71-(Transferrinrezeptormolekül)-Expression und schwacher CD45-Expression detektierbar (Terstappen, 1991; Loken, 1987).

Im Laufe der Zelldifferenzierung nimmt die Expression des Oberflächenantigens CD34 ab (Knapp, 1995; Sutherland 1989). So ist CD34 auf Lympho-, Mono-, Granulozyten und Thrombozyten im peripheren zirkulierenden Blut nicht detektierbar (Civin, 1984). Bei hämatologischen Erkrankungen mit Blastenbeteiligung können diese Blasten ebenfalls das CD34-Antigen exprimieren (Knapp, 1994). Auf ungefähr 60% der Zellen aller akuten lymphatischen Leukämien vom B-Zell-Typ (B-ALL) und auf über 80% der Zellen der akuten myeloischen Leukämien (AML) ist das CD34-Antigen nachweisbar (Terstappen, 1992). Die Funktion des CD34-Antigens ist bisher nicht vollständig geklärt, es scheint jedoch eine Rolle bei der Zelladhäsion von Stromazellen zu spielen. Weiterhin ist CD34, neben CD43 (Leukosialin), ein Substrat für die Phosphorylierung durch aktivierte Proteinkinase (Fackler, 1990). Dies gilt als Hinweis für eine mögliche Beteiligung von CD34 bei der Signaltransduktion für die Regulation der Expression anderer hämatopoetisch-assoziierten Gene (Holyoake, 1994, Majdic, 1994). Das CD34-Molekül auf Endothelzellen kann an IgG-Chimäre des Lectinmoleküls L-Selectin, die sich auf der Leukozytenoberfläche befinden, binden (Baumhueter, 1994).

Es existieren drei Klassen von Epitopen des CD34-Antigens, die sich hinsichtlich differentieller Sensitivität gegenüber bestimmten Enzymen (Glykoprotease aus *Pasteurella haemolytica*, Neuramidase und Chymopapain)

unterscheiden (Sutherland, 1992b), dargestellt in Tabelle 1. Die CD34-Antigene der Klasse-I-Antikörper (z.B. My10 (Civin, 1984), B1-3C5, 12.8 und ICH3) besitzen Epitope, die sensitiv gegenüber allen drei Enzymen sind. Klasse-II-Epitope der CD34-Antikörper wie QBEND-10 sind nur gegenüber Glykoprotease und Chymopapain empfindlich. Epitope der Klasse-III-Antikörper (z.B. p115.2, TUK3, 8G12 und HPCA-2) sind resistent gegenüber den oben genannten drei Enzymen. Bei Konjugation mit dem Fluorochromfarbstoff PE werden signifikant weniger CD34-exprimierende Zellen durch Klasse-I-CD34-Antikörper als durch Klasse-II- oder Klasse-III-CD34-Antikörper markiert (Serke, 1996). Ähnliche Ergebnisse existieren für den Fluorochromfarbstoff FITC (Siena, 1991). CD34-positive Stamm- oder Vorläuferzellen exprimieren neben Oberflächenantigenen oder zytoplasmatischen Molekülen auch Adhäsionsmoleküle und Zytokinrezeptoren (z.B. ein vom Protoonkogen c-kit kodierter Tyrosinkinase-Rezeptor).

Tab. 1: Epitopspezifitäten der CD34-Antikörper

CD34-Klasse	Sensitivität gegenüber		
	Glykoprotease	Neuramidase	Chymopapain
I	+	+	+
II	+	-	+
III	-	-	-

1.5.2 CD45

Die Familie des CD45-Oberflächenglykoproteins (leucocyte-common antigen = LCA) ist auf allen nukleären Zellen der hämatopoetischen Reihe nachweisbar. Es existieren insgesamt fünf verschiedene Isoformen (Thomas, 1989) mit einem Molekulargewicht zwischen 180 kDa und 220 kDa (Sunderland, 1979; Woollett, 1985).

Die Einteilung der monoklonalen Antikörper des CD45-Antigens (z.B. MRCOX-1) erfolgt nach der Reaktion mit entsprechenden Epitopen, nach der Definition des vierten „Leucocyte Antigen Workshop“. Es werden CD45-Antikörper, die gegen alle Epitope gerichtet sind, von CD45R-Antikörpern, welche lediglich mit Epitopen auf bestimmten Isoformen reagieren, unterschieden. Weiterhin können die CD45R-Antikörper je nach Determinierung des spezifischen Exons unterteilt werden: CD45RA, CD45RB, CD45RC (Isoform mit Sequenz des Exons A, B oder C) und CD45R0 (Erläuterung s. Abschnitt 1.5.1) (Lai, 1991; Streuli, 1988). Diese unterschiedlichen Molekülformen unterscheiden sich hinsichtlich der Kohlenhydratstruktur.

Das Glykoprotein CD45 wird von allen Zellen hämatopoetischen Ursprungs mit Ausnahme von Erythrozyten und Thrombozyten exprimiert (Dalchau, 1980). Es spielt eine wichtige regulatorische Rolle in der T-Zell-Aktivierung und besitzt Thyrosinphosphatase-Aktivität (Tonks, 1988).

1.5.3 CD33

Das Differenzierungsantigen CD33 ist ein Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 67 kDa und kann mit Antikörpern, wie z.B. T5A7, L4F3 und L1B2 (Andrews, 1983), nachgewiesen werden. Das Antigen wird auf dem langen Arm des Chromosoms 19 codiert (Peiper, 1988). Die CD34-positiven Progenitorzellen können mittels CD33-Expression in zwei Populationen unterteilt werden. Sehr frühe Progenitorzellen sind CD34-positiv und CD33-negativ; wohingegen weiter differenzierte CD34-positive Zellen eine Koexpression mit CD33 zeigen (Andrews, 1989). Neben leukämischen Zellen der akuten myeloischen Leukämie (Griffin, 1984; Robertson, 1992) wird das CD33-Antigen von CD34-positiven, panmyeloischen Zellen exprimiert (Andrews, 1989; Haas, 1993). Diesen Zellen gehören Blasten, Promyelozyten und Myelozyten des Knochenmarks (Griffin, 1984), Granulozyten und Monozyten des peripheren Blutes an und machen etwa die Hälfte bis zu zwei Drittel der hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, im mobilisierten, peripheren Blut und im Nabelschnurblut aus (61%, 73% und 54%). Dabei bestehen große interindividuelle Schwankungen mit einer Expressionsrate zwischen 20% und 94% (Hohaus, 1993). Das CD33-Antigen wird von einer größeren Population CD34-positiver peripherer Blutstammzellen ($82,5\% \pm 14,4\%$) im Vergleich zu CD34-positiver Knochenmarkstammzellen ($43,6\% \pm 19\%$), exprimiert (Bender, 1991; Tjonnford, 1994). Es ist das erste nachweisbare Granulo- und Monozyten-Antigen (CFU-GM). Auf Koloniebildenden Einheiten der Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten (CFU-GEMM) ist das Glykoprotein in ca. 50% der Fälle detektierbar und die Expression des CD33-Moleküls konnte auch auf Vorstufen der erythrozytären Reihe (BFU-E) nachgewiesen werden (Andrews, 1983; Andrews, 1986). Erythrozyten, Lymphozyten und Thrombozyten des zirkulierenden Blutes pluripotente hämatopoetische Progenitorzellen dagegen sind CD33-negativ (Robertson, 1992).

1.5.4 CD38

Das CD38-Antigen (T10-Antigen) hat ein Molekulargewicht von 45 kDa mit einem Proteinkern von 35 kDa. Die genaue Funktion des Oberflächenantigens ist bislang Gegenstand der Forschung, aber es scheint eine Funktion als Leukozyten-Aktivierungsantigen zu haben und eine cADP-Ribosyl-Cyclase-Aktivität zu besitzen (Dörken, 1990). Zellulär exprimiert wird es von frühen T-Lymphozyten des humanen Thymus (Thymozyten) (Terhorst, 1981; Reinherz, 1980), unreifen B-Zellen und Plasmazellen (Tedder, 1984), natürlichen Killerzellen (Nagler, 1990), mono-myeloischen Zellen und unreifen erythrozytären Zellen. Etwa 1% der CD34-positiven Zellen und 0,01% aller nukleären Zellen im Knochenmark zeichnen sich durch fehlende CD38-Antigenexpression aus. Diese Zellen entsprechen morphologisch einer homogenen Population unreifer Blasten (Terstappen, 1991). Nicht-linienzugehörige CD34-positive und CD38-negative Zellen zeichnen sich durch die Eigenschaft der Selbsterneuerung aus (Terstappen, 1991). Diese CD34-positiven und CD38-negativen Knochenmarkzellen besitzen bei zusätzlicher HLA-DR-Koexpression (s. Abschnitt 1.5.7.) die Fähigkeit zur Ausdifferenzierung in alle hämatopoetischen Zellreihen (Terstappen, 1994, Huang, 1992). Unreifere Zellen des Knochenmarks, die CD34-positiv, HLA-DR- und CD38-negativ sind, können in hämatopoetische Vorläuferzellen und in Stromazellen differenzieren (Huang, 1992; Haas, 1993). Diese Zellen zeigen oft eine Koexpression mit dem c-kit Rezeptor (CD117) und CD_w90 (Thy-1) (D`Arena, 1998).

Zwischen der Expression des CD38- und CD34-Antigens besteht eine Korrelation: Während die CD34-Expression im Laufe der Zelldifferenzierung abnimmt, steigt die CD38-Expression an. Auch während der Aktivierung von B-Lymphozyten kommt es zu einer zunehmenden Expression von CD38 (Terstappen, 1990). Die Expression des Differenzierungsantigens findet sich auf allen CD34-positiven Zellen, die zusätzlich linienzugehörige

Oberflächenantigene der erythrozytären (CD71), myeloischen (CD33), B-lymphozytären (CD10) und T-lymphozytäre (CD5, CD7) Reihe exprimieren (Terstappen, 1991). Morphologisch lassen sich diese Zellen in Erythro-, Myelo- und Lymphoblasten differenzieren.

1.5.5 CD41a

Die Zellen der megakaryozytären Reihe (Thrombozyten, Megakaryozyten und deren Vorläuferzellen) sind durch die Expression des β_3 -Komplex GPIIb/GPIIIa (GP = Glykoprotein) charakterisiert (Kanz, 1988). Dieser Komplex, synonym mit CD41/CD61-Komplex, kann durch Bindung von CD41a- oder CD61-Antikörper, nach zuvor sorgfältiger Entfernung der ebenfalls an diese Antikörper bindenden peripheren Thrombozyten, identifiziert werden. Das CD41a-Antigen entspricht der GPIIb-Untereinheit des Fibrinogenrezeptors und kann als β_3 -Komplex an Adhäsionsmoleküle wie Fibrinogen, Fibronectin, von Willebrand-Faktor (vWF) und Vitronectin binden (Phillips, 1988). Dieser Komplex mit einem Molekulargewicht von 135 kDa vermittelt durch Fibrinogen die Thrombozytenaggregation, induziert von Thrombin, Kollagen und Adenosindiphosphat (ADP). Die Bindung an Fibronectin und an den von Willebrand-Faktor bewirkt die Adhäsion und Ausbreitung von Thrombozyten auf dem Subendothel (Phillips, 1988). Die Expression des CD41a- und CD42b-Antigens kann durch Thrombopoetin gesteigert werden (Date, 1997). Innerhalb der CD34-positiven Zellpopulation humaner fetaler Knochenmarkprogenitorzellen finden sich unter den zusätzlich auch CD41a-exprimierenden Zellen alle Kolonie-bildenden Einheiten der megakaryozytären Reihe (Murray, 1996a). Weiterhin scheint eine Korrelation zwischen der Anzahl der CD34-positiven Progenitorzellen mit einer CD41a-Koexpression und der Rekonstitution von Thrombozyten nach einer Stammzellreinfusion zu bestehen (Feng, 1998).

1.5.6 CD_w90

Mit einem Molekulargewicht von 25 kDa bis 35 kDa ist CD_w90 (Thy-1) das leichteste der aufgeführten Oberflächenantigene. Die Sequenz des Gens ist auf dem langen Arm des Chromosoms 11 lokalisiert. Das CD_w90-Antigen ist stark glykolysiert und in der Zellmembran mittels Glykosylphosphatidylinositol verankert (Lansdorp, 1995). Es wird von Nerven- und Bindegewebe und von verschiedenen Stromazelllinien exprimiert. Lediglich auf 0,05% bis 0,1% der fetalen Knochenmarkstammzellen ist das Differenzierungsantigen CD_w90 mittels Antikörper, wie 5E10, nachweisbar. Dagegen weisen 5% bis 25% der adulten CD34-positiven Knochenmarkstammzellen eine Koexpression des CD_w90-Antigens auf (Craig, 1993; Murray, 1994; D'Areña, 1998). Diese Population zeigt vermehrte hämatopoetische Stammzellaktivität (Murray, 1996a) und hat das Potential, in T-, B- und myeloische Vorläuferzellen zu differenzieren (Murray, 1995).

Die Thy-1-Expression findet sich auf funktionell und immunphänotypisch sehr unreifen Zellen, die sich zusätzlich durch fehlende Expression von CD38 und HLA-DR auszeichnen. Auch weitere linienzugehörige Oberflächenantigene sind nicht detektierbar, lediglich eine Koexpression des c-kit-Rezeptor (CD117) (D'Areña, 1998). Diese CD34- und CD_w90-koexprimierenden Zellen ohne weitere linienzugehörigen Differenzierungsantigenen zeigen eine Anreicherung an hämatopoetischer Stammzellaktivität (Murray, 1996b).

Im Laufe der Zelldifferenzierung nimmt die CD_w90-Expression der Knochenmarkstammzellen ab (Williams, 1985), während Antigene wie CD45RO, CD38 und CD71 vermehrt exprimiert werden (Lansdorp, 1990; Craig, 1993; Terstappen, 1991). Leukämische Zellen sind meist Thy-1-negativ, nur in ca. 10% der Fälle ist das Oberflächenantigen nachweisbar (Holden, 1995). Die

Höhe der CD_w90-Expression ist individuell verschieden und abhängig von der Zeit nach Mobilisierung mit Wachstumsfaktoren (Murray, 1995). Die genaue Funktion des Proteins Thy-1 ist unbekannt, nach heutigem Wissensstand ist es involviert in die T-Zell-Aktivierung, die Zelladhäsion und in der Zell-zu-Zell- und Zell-zu-Stroma-Interaktion (Gunter, 1984; Kroczek, 1986 a; Kroczek, 1986 b).

1.5.7 HLA-DR

Das HLA-DR-Antigen mit einem Molekulargewicht von 29 kDa bis 33 kDa ist ein Synonym für die Bezeichnung MHC-Klasse-II-Antigen (major histocompatibility = MHC). Es ist auf $11\% \pm 4\%$ der humanen peripheren Lymphozyten detektierbar und wird weiterhin von follikulär dendritischen Zellen, Langerhans'schen Zellen, Makrophagen, B-Zellen und aktivierten T-Zellen exprimiert. Ursprüngliche Vorläuferzellen sind HLA-DR-negativ. Die Expression nimmt im Laufe der Ausdifferenzierung zu (Tong, 1994). Die Expression von HLA-DR zeigt ebenso wie die des CD38-Antigens eine große Variation, von negativ bis zu starker Expression (Terstappen, 1991) in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Zelle. Die biologische Funktion des HLA-DR-Antigens wird deshalb in der Regulation der Hämatopoese gesehen. Die unterschiedliche Ausprägung der HLA-DR-Expression charakterisiert die Zelllinienzugehörigkeit: Unreife Vorläuferblasten-CFU sind HLA-DR-negativ, schwach positive HLA-DR-Expression kennzeichnen erythrozytäre Vorläufer (BFU-E) und stark HLA-DR-positive Zellen sind Vorläuferzellen der granulo-monozytären Reihe (CFU-GM) (Civin, 1987; Lu, 1987; Sieff, 1982). CD34-positive und HLA-DR-negative Zellen sind zu 5% im Knochenmark, zu 29% im peripheren, zirkulierenden Blut nach Mobilisation und zu 3% im Nabelschnurblut mit interindividuellen Schwankungen nachweisbar. Das HLA-Klasse II-Antigen ist involviert in die zelluläre Interaktion von Lymphozyten und Makrophagen und von T- und B-Lymphozyten und spielt eine Rolle in der Zelltoxizität.

1.6 Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper sind gegen ein einzelnes definiertes Immunglobulin mit Affinität zu einem bestimmten Epitop gerichtet. Sie finden u.a. Verwendung in der Immunfluoreszenztechnik zur Markierung von Zelloberflächenantigenen. Es existieren zwei Methoden zur Markierung: die direkte und die indirekte Markierung. Bei der direkten Methode wird der Fluoreszenzfarbstoff direkt an den Antikörper gekoppelt. Die indirekte Methode beinhaltet einen zweiten Antikörper, der an einen Fluoreszenzfarbstoff gebunden ist und gegen den ersten Antikörper gerichtet ist.

Die Herstellung der monoklonale Antikörper erfolgt mittels Immunisierung von Mäusen durch wiederholte Injektion mit einem bestimmten Antigen. Die aus der Milz der Mäuse gewonnenen Zellen mit der Fähigkeit zur Antikörperproduktion werden mit Myelomzellen in-vitro verschmolzen und damit potentiell unsterblich gemacht. Diese fusionierten Zellen werden zu Klonen herangezogen, die auf eine Ursprungszelle zurückgehen und Antikörper, die gegen ein einzelnes Epitop gerichtet sind, produzieren. Eine gemeinsame Nomenklatur der Antikörper, die gegen das gleiche Zelloberflächenantigen gerichtet sind, wurde durch die Klassifizierung in „cluster of differentiation“ (CD) eingeführt (Bernard, 1984). Die folgenden Angaben in der Bezeichnung beziehen sich auf die entsprechende Zellpopulation und das Molekulargewicht des spezifischen Antigens. Eine weitere Charakterisierung des Antigens erfolgt durch Voranstellung der Buchstaben p (engl. protein), gp (engl. glycoprotein), gl (engl. glycolipid), CHO (engl. carbohydrate) oder u (engl. unknown).

1.7 Ziel der Untersuchungen

Klinisch werden derzeit vorwiegend zwei unterschiedliche Einfrierprotokolle (zum einen 10% DMSO, 1,5 K/min; zum anderen 5% DMSO + 6% HES, 5 K/min) zur Kryokonservierung von hämatopoetischen Progenitorzellen eingesetzt. Ein Kriterium ist die Wiederfindungsrate und die Anzahl der nicht-letalen bzw. vermehrungsfähigen Zellen (Messung mittels Membranintegritätsbestimmung oder klonogenen Kulturassays mit quantitativer Bestimmung der Zellkolonien). Ob jedoch die Oberflächenantigene und damit die Linienzugehörigkeit der Zellen durch unterschiedliche Einfrierprotokolle verändert werden, ist bislang wenig untersucht. Mit dieser Arbeit sollte der Einfluß der Kühlrate und der Kryoprotektivzusammensetzung auf die durchflußzytometrische Analyse von Oberflächenantigenen von kryokonservierten, peripheren hämatopoetischen Blutstammzellen aus Aphereseprodukten untersucht werden. Dafür wurden verschiedene Einfrierprotokolle, die sich hinsichtlich der Konzentrationen der Gefrierschutzadditive DMSO und HES und hinsichtlich der Kühlrate unterschieden, herangezogen. Ziel der Arbeit war es, ggf. Unterschiede bei den einzelnen Kryokonservierungsprotokollen festzustellen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Untersuchungsmaterial

Es wurden Aliquots der Aphereseprodukte von 6 Patienten (4 Frauen und 2 Männer) untersucht, die im Rahmen ihrer Erkrankung einer Zytapherese zur Gewinnung peripherer Progenitorzellen in der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unterzogen wurden. Zusätzlich wurde ein Aliquot eines gesunden männlichen Spenders analysiert. Bei einem Patienten wurden 2 Apheresen im Abstand von 24 Stunden durchgeführt, so daß die Anzahl der analysierten Aphereseprodukte insgesamt 8 betrug. Die Auswahl der Patienten erfolgte zufällig und nach deren Zustimmung über die Entnahme des Aliquots.

Die Patienten waren im Alter von 18 bis 62 Jahren, durchschnittlich 48 Jahre alt. Zur Mobilisierung der Stammzellen wurden die Patienten vor der jeweiligen Apherese mit dem Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF) in einer Dosis von 10 bis 24 $\mu\text{g}/\text{Tag}/\text{kg}$ Körpergewicht über einen Zeitraum von 5 bis 7 Tagen behandelt. Die Diagnosen der Patienten beinhalteten maligne hämatologische Erkrankungen und solide Tumorerkrankungen, z.B. Mammakarzinom und Ewing-Sarkom. Die Entnahme der peripheren Blutstammzellen mit dem Apherese-Gerät Spectra (Fa. Cobe, Heimstetten) erfolgte vor einer Hochdosis-Chemotherapie und anschließender Reinfusion. In Tabelle 2 sind die Patientendaten und Therapieschemata zusammenfassend dargestellt.

Tab. 2: Patientendaten und Therapieschemata

Geschlecht	Alter	Diagnose	Chemotherapie	G-CSF µg/d/kgKG	Tage
w	51	Mamma-Ca	Cyclophosphamid + Epirubicin	10	5
w	61	Mamma-Ca	Cyclophosphamid + Epirubicin	10	5
w	62	Mamma-Ca	Cyclophosphamid + Epirubicin	10	7
w	17	Ewing- Sarkom	Etoposid + Vincristin + Adriamycin + Ifosfamid + Mesna + Actinomycin D	2 x 6	7
m*	51	Non-Hodgkin- Lymphom	Cyclophosphamid + Vincristin + Prednison	10	6
m*	51	Non-Hodgkin- Lymphom	Cyclophosphamid + Vincristin + Prednison	10	7
m	36	gesund	keine	k.A.	k.A.
m	54	Plasmozytom	Vincristin + Adriamycin + Doxorubicin	2 x 12	5

* = derselbe Patient, Apherese an zwei aufeinanderfolgenden Tagen

k.A. = keine Angaben

2.2 Kryokonservierung

Die Durchführung entspricht der bereits bei Jetter beschriebenen (Jetter,1998).

2.2.1 Kryoprotektive Lösungen

Es erfolgt der Einsatz vier kryoprotektiver Lösungen. Zur Herstellung dieser Kryoprotektivlösungen werden DMSO (Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. K20471078429), HES (HES 70000, Fa. Braun, Melsungen), salzarmes 20%iges humanes Serumalbumin (HSA, Fa. Behring, Marburg) und phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS Dulbeccos Puffer, Fa. Life Technologies, Paisley, Großbritannien, Art.-Nr. 14190-094) verwendet. Die Angaben der Konzentrationen (in Gewichts-%) sind in Tabelle 3 dargestellt. Die Konzentration der Kryoprotektivlösungen beträgt das Doppelte der gewünschten Konzentration, da die Lösungen im Verhältnis 1:2 mit dem Stammzellpräparat gemischt werden. Nach Mischen und Autoklavieren von DMSO, HES und PBS-Puffer erfolgt die Zugabe von ebenfalls autoklavierter Human-Albumin-Lösung unter sterilen Bedingungen (Werkbank Fa. Heraeus, Ha 2448 GS). Bis zur Verwendung dient ein -40°C-Kühlschrank zur Lagerung der proportioniert abgefüllten Lösungen.

Tab. 3: Kryoprotektive Lösungen [Gew.-%]

Komponenten	10% DMSO 0% HES	7,5% DMSO 2,5% HES	5% DMSO 6% HES	2,5% DMSO 7,5% HES
DMSO (%)	20	15	10	5
HES (%)	0	5	12	15
HSA (%)	8	8	8	8
PBS (%)	72	72	70	72

2.2.2 Einfrierprotokolle

Die Kombination der vier verschiedenen Kryokonservierungslösungen mit sechs unterschiedlichen Kühlraten (1,5, 5, 10, 15, 20, 160 K/min) ergibt insgesamt 24 Einfrierprotokolle, dargestellt in Tabelle 4.

Tab. 4: Protokolle zur Kryokonservierung

Kühlrate	10% DMSO 0% HES	7,5% DMSO 2,5% HES	5% DMSO 6% HES	2,5% DMSO 7,5% HES
1,5 K/min	1	2	3	4
5 K/min	5	6	7	8
10 K/min	9	10	11	12
15 K/min	13	14	15	16
20 K/min	17	18	19	20
160 K/min	21	22	23	24

2.2.3 Einfriervorgang

Das Aliquot des Aphereseproduktes wird im Verhältnis 1:2 mit autologem Plasma gemischt. Vor dem Einfrieren des Aliquots wird die Gesamtleukozytenzahl am Coulter-Counter Coulter S plus STKR (Fa. Coulter Electronics, Krefeld) bestimmt. Zur Kryokonservierung werden 750 µl des Aliquots in ein Röhrchen (Nalgene Cryogenic Vials 2 ml, Fa. Nalgene, Rochester, USA), welches bei 4°C gelagert wird, pipettiert. Anschließend wird dreimalig alle 90 sec je 250 µl der jeweiligen, auf 4°C abgekühlten Kryoprotektivlösung dazugegeben.

Abgekühlt wird mit 6 verschiedenen Kühlraten, definiert als $\Delta T/\Delta t$ in K/min, die mittels unterschiedlicher Einfriermethoden erreicht werden. Sie sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 5: Kühlrate und Einfrierprotokoll / Gerät

Kühlrate	Einfriermethode / Gerät
1,5 K/min	Kryo 10-16
5 K/min	-80°C-Kühlschrank
10 K/min	Kryo 10-16
15 K/min	Kryo 10-16
20 K/min	Dampfphase von flüssigem Stickstoff
160 K/min	Direktes Eintauchen in flüssigen Stickstoff

Die kryokonservierten Aliquots werden bei unter -150°C in der Dampfphase über flüssigem Stickstoff in einem Flüssigstickstoff-Lagertank Chronus Biosafe (Fa. Messer-Griesheim) bis zum Auftauen aufbewahrt. Die maximale Lagerungszeit beträgt 20 Monate.

2.2.4 Auftau- und Waschvorgang

Die aus dem Flüssigstickstoff-Lagertank entnommenen kryokonservierten Proben werden für 3 min in einem 37°C warmen Wasserbad (Typ 1083, Fa. GFL, Hannover) mit einer Schüttelfrequenz von 1,5 Hz in horizontaler Position aufgetaut. Anschließend erfolgt die Weiterverarbeitung der Proben bei 4°C , gelagert in Eiswasser.

In ein 13ml-Polystyrol-Röhrchen (Fa. Greiner Labortechnik), dessen Gewicht leer gemessen wurde, wird 1 ml des Aliquots vorgelegt und diese mit Waschmedium I und II gewaschen. Die Waschmedien setzen sich aus RPMI-1640-Medium (Fa. Life Technologies) mit fetalem Kälberserum (FKS, Fa. GIBCO), ACD-A (Fa. Fresenius, Bad Homburg) und Heparin in einer Konzentration von 75 IE/ml (Fa. Hoffmann-La Roche AG) zusammen. Lediglich in der Konzentration von ACD-A unterscheiden sich Waschmedium 1 und 2. Den Anteil (in Volumen-%) der einzelnen Reagentien der Waschmedien zeigt Tabelle 6.

Tab. 6: Zusammensetzung der Waschmedien [Volumen-%]

Reagentien	Waschmedium I	Waschmedium II
ACD-A (%)	30	10
FKS (%)	10	10
Heparin (%)	10	10
RPMI-Medium (%)	50	70

Zur Entfernung des Kryoprotektivs werden insgesamt 10 ml Waschmedium I innerhalb von 6 min zugesetzt. Dafür wird 8 mal je 250 µl des Waschmediums I, schrittweise alle 30 sec, hinzugefügt. Zwischen den Vorgängen wird die Zellsuspension für 15 sec mit einem Vortex-Gerät (Genie 2TM, Bender & Hobein AG) auf mittlerer Geschwindigkeit gemischt. Anschließend erfolgt alle 30 sec insgesamt 7 mal die Zugabe von je 1000 µl des Waschmediums I und jeweils alle 15 sec ein Durchmischen der Suspension. Die Zellsuspension wird bei 200 g, 4°C und ohne Bremsung für 5 min zentrifugiert (Megafuge 1.OR, Heraeus Instruments). Nach der Zentrifugation der Zellsuspension wird der Überstand dekantiert und das Pellet resuspendiert.

Die Waschschrte werden in gleicher Weise mit Waschmedium II wiederholt. Nach Dekantieren des Überstandes folgt die Resuspendierung mit 2 ml PBS-

Puffer und das Röhrchen wird erneut gewogen. Eine repräsentative Probe wird zur Bestimmung der MNC-Konzentration im Coulter-Counter gemessen. Anhand des errechneten Verdünnungsfaktors (Gewichtsdifferenz der Röhrchen vor und nach dem Auftau-Waschvorgang) wird mittels Multiplikation mit der MNC-Konzentration die Gesamtzahl der mononukleären Zellen pro Milliliter in der aufgetauten Probe folgendermaßen berechnet.

$$\text{M.I. [\%]} = \left(1 - \frac{\text{nicht-intakte Zellen}}{\text{intakte und nicht-intakte Zellen}} \right) \times 100$$

2.3 Membranintegritätsbestimmung mit Trypanblau

Das aufgetaute und gewaschene Apheresat wird mit 0,9%iger Natrium-Chlorid-Lösung (Baxter AG, Schweiz) im Verhältnis 1:2 verdünnt. Ein Aliquot von 10 µl dieser Zellsuspension wird mit 90 µl Trypanblau (0,4%, Fa. Sigma, Deisenhofen) gemischt und 10 µl dieser Mischung werden ohne Inkubation in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop bei einer Vergrößerung von 1:40 ausgezählt. In Zellen, die keine intakte Zellmembran vorweisen, kann der Farbstoff penetrieren und sie erscheinen blau, dagegen stellen sich Zellen mit intakter Zellmembran ungefärbt dar. Es werden alle trypanblaugefärbten Leukozyten gezählt und daraus der prozentuale Anteil der Zellen mit intakter Membran berechnet.

2.4 Durchflußzytometrie

2.4.1 Probenvorbereitung

Die maximale Lagerungszeit der Proben bis zur Messung beträgt 6 Stunden bei einer Raumtemperatur von $22 \pm 2^\circ\text{C}$ unter ständiger Durchmischung der Proben zur Vermeidung von Zellaggregation. Im Coulter-Counter wird die Gesamtleukozytenzahl für die Berechnung der Vorverdünnung bestimmt. Für die durchflußzytometrische Messung wird eine Vorverdünnung des Aliquots von etwa 10.000 Leukozyten/ μl mit phosphatgepufferter Lösung hergestellt, dies entspricht einer Zellzahl von 1×10^6 Leukozyten/100 μl Stammzellprobe. Bei dieser Leukozytenkonzentration ist die zugegebene Antikörpermenge qualitativ gebunden.

2.4.2 Inkubation mit monoklonalen Antikörpern

Alle verwendeten Antikörper sind direktkonjugierend und werden von der Firma Coulter-Immunotech (Hamburg) mit Ausnahme des CD34-Antikörpers (PE), der von der Firma Becton Dickinson GmbH (Heidelberg) stammte, bezogen. Die jeweiligen Fluorochromfarbstoffe der verwendeten Antikörper sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 7: Fluorochromfarbstoffe der verwendeten Antikörper

Fluorochromfarbstoff	Antikörper
PE-Cyanid	CD45
PE	CD34
FITC	CD33, CD38, CD41a, CDw90, HLA-DR

Die entsprechende Antikörperkonzentration wird durch laborinterne Titration ermittelt. Insgesamt werden pro Ansatz 7 Röhrchen (FALCON 2052, Becton Dickinson) aus Polyethylen, das eine geringe Adhäsivität hat und somit den Zellverlust minimiert, benötigt. Ins erste Röhrchen wird 10 µl CD3/CD19 (FITC/PE) vorgelegt. Das 2. Röhrchen beinhaltet 5 µl CD45-Antikörper (FITC) und 10 µl CD34-Antikörper (PE). Für die Subpopulationsbestimmungen werden in das 3. bis 7. Röhrchen je 5 µl CD45-Antikörper, je 10 µl CD34-Antikörper und für die jeweilige Subpopulation 10 µl CD33- CD38-, CD41a-, CD_w90-Antikörper bzw. 5 µl HLA-DR- Antikörper pipettiert.

In alle Röhrchen wird zu den Antikörpern jeweils 100 µl der oben genannten Vorverdünnung pipettiert. Der Ansatz wird durch ein „vortex“-Gerät (VF 2, Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik) in mittlerer Einstellung gemischt und vor Licht geschützt 15 min bei 4°C inkubiert. Bei geringer CD34-Zellzahl vor der Kryokonservierung (unter 5,0 CD34-Zellen/kg Körpergewicht) erfolgt bei doppelter Antikörpermenge der Einsatz von 200 µl Vorverdünnung.

2.4.3 Erythrozytenlyse

Zur Vermeidung von Störsignalen in Form von Erythrozyten werden diese mit Hilfe von 2 ml EDTA-Ammonium-Chlorid-Lysereagens (Lysing Reagent Orthomune, Ortho-Diagnostic System GmbH, USA) entfernt. Dazu wird nach Zugabe des Lysereagens der Ansatz 10 min bei 4°C inkubiert und während der Inkubationszeit dreimalig gemischt.

2.4.4 Waschvorgang

Nach der Erythrozytenlyse erfolgt die Elimination des Lysereagens und die Entfernung ungebundener Antikörper. Die Waschschriffe bestehen aus Zentrifugation (Hettich-Zentrifuge ROTIXA/A, Hettich, Tuttlingen) bei 3500 g Umdrehungen für 5 min ohne Bremsung, dem Dekantieren des Überstandes und dem Resuspendieren des Pellets mit 2 ml phospatgepufferter Lösung. Nach nochmaligem Waschen der Zellsuspension wird das Sediment mit 1 ml PBS-Puffer pelletiert und vor der Messung durch einen Zellfilter mit einer Porendurchlässigkeit von 35 µm (FALCON 2235-Filter, Becton Dickinson, USA) gegeben, um störende Zellaggregate herauszufiltern.

2.4.5 Datenakquisition am Durchflußzytometer

Die Messung erfolgt am FACScan-Gerät (Becton Dickinson). Zur Kontrolle der Kompensation des FACScan-Gerätes und Positionierung der Zellpopulation wird eine Messung von 10.000 Zellen, mit den Antikörpern CD3 (FITC) und CD19 (PE) markiert, vorgenommen. Dabei werden alle Zellen gemessen. Die Darstellung FSC/SSC dient zur Eingrenzung der Lymphozytenpopulation (Region 1), die in den Zweiparameter-Punkthistogrammen (dot plot) CD3/CD19

und SSC/CD3 dargestellt werden. In diesem Punkthistogramm entspricht jeder dargestellte Punkt dem Meßwert von mindestens einer Zelle.

Anschließend werden mit dem 2. Röhrchen 50.000 Zellen zur Erfassung der CD34-positiven Progenitorzellen akquiriert. Das Zweiparameter-Punkthistogramm FSC/SSC zeigt alle Zellpopulationen und mit FSC/CD45 erfolgt die Einstellung des Schwellenwertes (Threshold), um die Zelltrümmer auszugrenzen. Die CD45-positiven Zellen werden als Population Region 2 definiert und damit das Punkthistogramm SSC/CD34 erstellt. Alle CD34-exprimierenden Progenitorzellen werden in der Population Region 3 zusammengefaßt.

Die Subklassenakquisition wird jeweils mit 1.000 CD45- und CD34-positiven Zellen, im „Lifegate“ gemessen, vorgenommen. Messung im „Lifegate“ heißt, daß in diesem festgelegtem Gate genau 1.000 Zellen akquiriert werden. Bei zu geringer Zählrate wird die Messung nach 12 min beendet (= alle Patienten mit einer CD34-Zellzahl $<5,0/\text{kg}$ Körpergewicht vor Kryokonservierung). Dargestellt wird dieses in den jeweiligen Punkthistogrammen CD33/CD34, CD38/CD34, CD41a/CD34, CD_w90/CD34 und HLA-DR/CD34.

2.4.6 Auswertung

Die Datenauswertung erfolgt mit der Software CellQuest™ (Becton Dickinson). Die Darstellung FSC/SSC dient zur Eingrenzung der Lymphozytenpopulation (Region 1). Hierfür werden die CD3-positiven Zellen eingegrenzt und eine Quadranten-Statistik erstellt. Diese Quadranten-Statistik wird auf das Punkthistogramm SSC/CD34 (s.u.) kopiert. Die Kontrolle der Kompensation wird mittels Darstellung der CD3-positiven Zellen versus SSC vorgenommen. Die CD45-positive Zellpopulation (Leukozyten) wird in der Darstellung SSC/CD45 gegatet (Region 2) in der Region Statistik dargestellt. Die Region 2

wird verwendet, um unter den CD45-positiven Zellen die zusätzlich auch CD34-positiven Progenitorzellen (Region 3) ausfindig zu machen. Dieses erfolgt in dem Punkthistogramm SSC/CD34 aus Region 2. Als Plausibilitätskontrolle der CD45- und CD34-positiven Zellen werden die Darstellungen FSC/SSC und SSC/CD45 aus Region 3 eingesetzt.

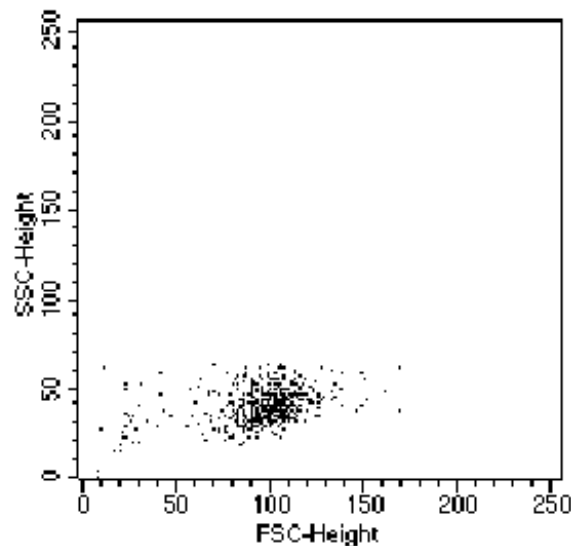


Abb. 4: Beispiel eines Zweiparameter-Punkthistogramms CD34 / CD45

Korrelationsdarstellung der Parameter Vorwärtsstreulicht = FSC (x-Achse, linear) und Seitwärtsstreulicht = SSC (y-Achse, linear). Plausibilitätskontrolle: Die CD45-positiven Zellen mit CD34-Koexpression (Region 3) bilden eine geschlossene und umschriebene Population im Bereich der mononukleären lymphozytären Zellen.

Für die Messung der Subklassen wird ein anderer CD45-Antikörper (Phycoerythrin-Cyanid 5 = PECy5) verwendet. Zur Akquisition der CD45-positiven Zellen (Region 4) wird das Punkthistogramm SSC/CD45 gewählt und eine Statistik eingefügt. Es erfolgt mit der Region 4 die Darstellung der CD34-positiven Progenitorzellen (=Region 5) mittels SSC/CD34. Dafür wird mit dem definierten Quadrant aus dem Punkthistogramm SSC/CD3 die Begrenzung der CD34-positiven Zellpopulation festgelegt. Die Subklassen werden mit den Darstellungen CD33/CD34, CD38/CD34, CD41a/CD34, CD_w90/CD34 und HLA-DR/CD34 aus den Regionen 4 und 5 dargestellt. Das Quadrant aus SSC/CD3 wird in das Punkthistogramm kopiert und eine Quadranten-Statistik erstellt. Die Population der CD34-positiven Progenitorzellen aus Region 4 und 5 wird mit der Darstellung SSC/CD45 und SSC/CD34 kontrolliert.

2.4.7 Statistik

Die Meßwerte der Wiederfindungsrate und Subpopulationen wurden dem Wilcoxon-Test für paarige Stichproben unterzogen. Dazu wurden die Meßwerte mit den verschiedenen Kühlraten und Kryoprotektiv-zusammensetzungen gegen den Wert des „Standardprotokolls“ (10% DMSO, Kühlrate von 1,5 K/min) auf signifikante Unterschiede hin getestet.

Der Wilcoxon-Test ist ein Prüfverfahren für kleine unabhängige Stichproben, der geeignet ist, 2 Meßreihen auf die gleiche Verteilung zu prüfen. Dabei werden zuerst die Differenzen aus den Wertepaaren gebildet und mit Vorzeichen aufgelistet. Anschließend wird eine Rangliste aus den Absolutwerten der Differenzen gebildet. Dann werden die Ränge addiert, die zu den Differenzen mit dem selteneren Vorzeichen gehören. Funktion dieses Testes ist es, zu berechnen, in wie weit der Unterschied der Rangmittel signifikant ist. Von signifikanten Unterschieden wird bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ ausgegangen (Sachs, 1992).

3 ERGEBNISSE

3.1 Zytapherese

Das jeweilige Blutvolumen der Patienten betrug im Mittel 4816 ml mit einer Spannweite von 3284 ml bis 5811 ml. Bei einem Antikoagulantien-Verbrauch von durchschnittlich 878,7 ml Citrat, bei einem Minimalwert von 65,7 ml und einem Maximalwert von 1666 ml, wurden Fließraten von 54 ml/min mit einer Spannweite von 45 bis 70 ml/min für Citrat erreicht. Durchschnittlich wurden 4186 IE (3000 IE bis 5600 IE) Heparin mit einer Fließzeit von 4,7 ml/min (2,1 bis 6,9 ml/min) bzw. 1:18 Tropfen/min (1:16 bis 1:20 Tropfen/min) eingesetzt. Die zwischen 225 min und 268 min dauernde Apherese mit einem Mittelwert von 252 min ergab im Mittel ein prozessiertes Blutvolumen von 13632 ml. Die Spannweite betrug 10814 ml bis 18202 ml bei einer Sammelrate von 1,0 ml/min, in einem Fall eine Sammelrate von 1,2 ml/min. Das Aphereseprodukt ergab ein Produktvolumen von 215 ml bis 256 ml, durchschnittlich 239 ml.

3.2 Wiederfindungsrate

Die durchschnittliche Wiederfindungsrate wurde nach dem Auftauen der Aliquots und den folgenden Waschschritten im Coulter-Counter bestimmt. Die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen in Prozent sind in Tabelle 8 wiedergegeben und die Ergebnisse in Abbildung 5 graphisch dargestellt. Bei Kühlraten von 1,5, 5, 10 und 15 K/min beträgt die Wiederfindungsrate zwischen 70-80%, bei höheren Kühlraten (>20 K/min) kommt es zu einem statistisch signifikanten Abfall der Zellzahl im Vergleich zur Ausgangskonzentration. Diese Daten bestätigen die bereits von Jetter gefundenen Ergebnisse (Jetter, 1998).

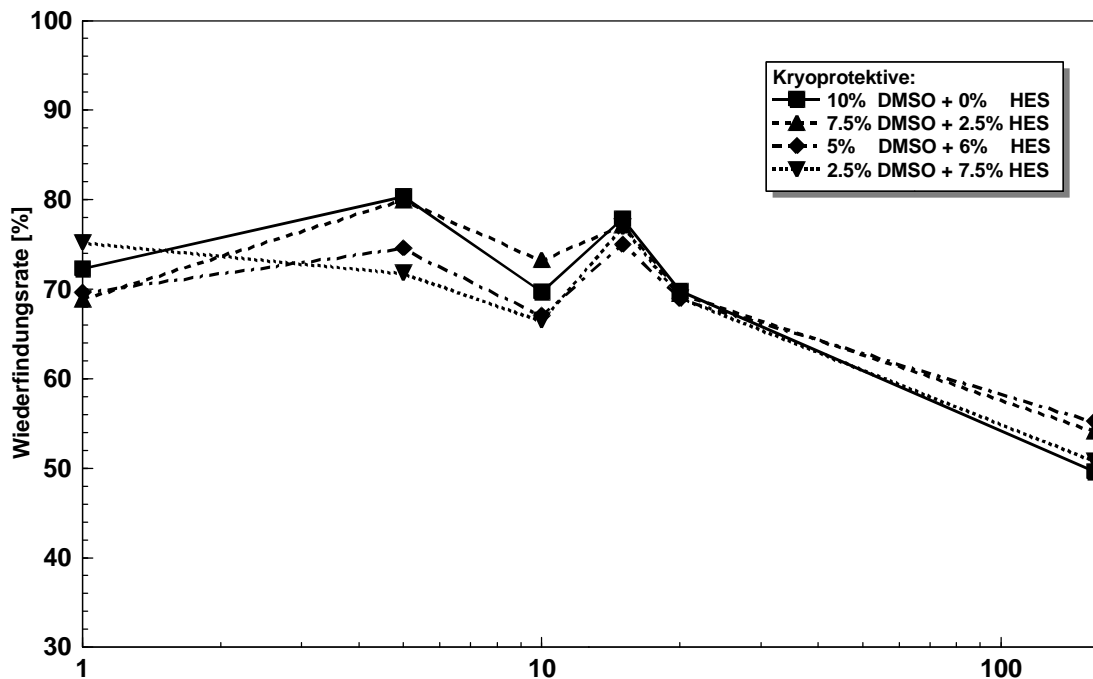


Abb. 5: Wiederfindungsrate nach dem Auftau- und Waschvorgang (n=8)

Die Kryokonservierungsprotokolle 5, 11, 12, 14, 21, 22, 23 und 24 (siehe Abschnitt 2.2.2, S.45) waren signifikant verschieden vom „Standardprotokoll“ (1,5 K/min, 10% DMSO).

Tab. 8: Mittelwert und Standardabweichung der Wiederfindungsrate [%]

Kryoprotektiv Kühlrate	10% DMSO 0% HES	7,5% DMSO 2,5% HES	5% DMSO 6% HES	2,5% DMSO 7,5% HES
1,5 K/min	72,3 ± 9,6	68,9 ± 12,2	69,6 ± 10,7	75,2 ± 8,7
5 K/min	80,3 ± 8,5	80,0 ± 10,7	74,6 ± 9,6	71,8 ± 9,3
10 K/min	69,7 ± 13,1	73,3 ± 10,3	67,0 ± 6,4	66,5 ± 8,0
15 K/min	77,9 ± 8,0	77,2 ± 10,0	75,0 ± 6,6	77,0 ± 10,4
20 K/min	69,8 ± 9,9	69,5 ± 9,7	69,0 ± 12,4	69,0 ± 9,1
160 K/min	48,6 ± 6,7	54,1 ± 8,8	55,2 ± 11,2	50,8 ± 10,5

3.3 Membranintegritätsbestimmung

Die Membranintegritätsbestimmung wurde nach dem Auftauen und dem Waschvorgang der Aliquots mit dem Farbstoff Trypanblau durchgeführt. In Abbildung 6 ist der prozentuale Anteil der sich nicht mit Trypanblau angefärbten Zellen dargestellt, die dazugehörigen Mittelwerte und Standardabweichungen in Prozent finden sich in Tabelle 9. Aus den Darstellungen wird ersichtlich, daß die Membranintegrität der aufgetauten und gewaschenen Stammzellprobe bei Kühlraten >10 K/min statistisch signifikant abnimmt. Auch diese Daten decken sich mit den von Jetter beschriebenen Ergebnissen (Jetter, 1998).

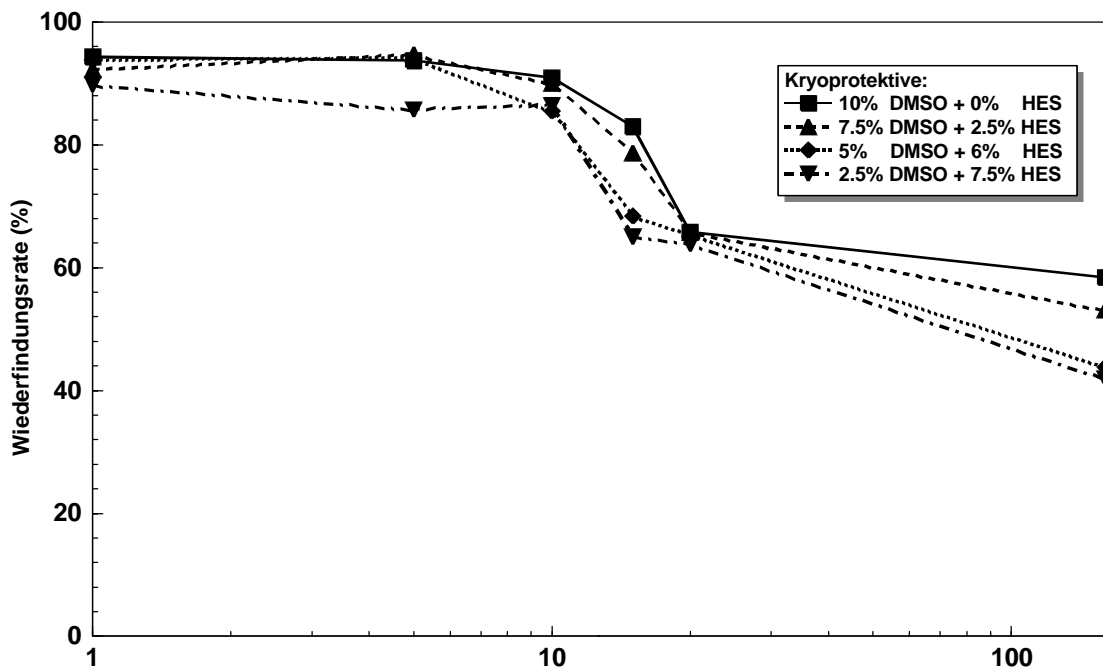


Abb. 6: Membranintegritätsbestimmung mit Trypanblau (n=8)

Die Kryokonservierungsprotokolle 8 und 13 bis 24 (siehe Abschnitt 2.2.2, S.45) waren signifikant verschieden vom „Standardprotokoll“ (1,5 K/min, 10% DMSO).

Tab. 9: Mittelwert und Standardabweichung der Membranintegrität [%]

Kryoprotektiv Kühlrate	10% DMSO 0% HES	7,5% DMSO 2,5% HES	5% DMSO 6% HES	2,5% DMSO 7,5% HES
1,5 K/min	94,3 ± 8,9	92,2 ± 4,5	93,8 ± 5,6	89,8 ± 3,6
5 K/min	93,7 ± 6,9	94,7 ± 8,9	94,1 ± 2,9	85,7 ± 6,3
10 K/min	90,9 ± 8,2	90,0 ± 11,4	85,5 ± 4,8	86,4 ± 7,7
15 K/min	82,9 ± 2,8	78,7 ± 8,9	68,4 ± 6,1	65,0 ± 5,9
20 K/min	65,8 ± 10,1	65,7 ± 9,9	65,4 ± 11,3	63,8 ± 12,3
160 K/min	58,4 ± 14,5	53,1 ± 6,9	43,8 ± 13,9	41,9 ± 15,9

Die Wiederfindungsrate der membranintakten Zellen wird durch die Multiplikation aus dem prozentualen Anteil membranintakter Zellen (Membranintegritätsbestimmung) mit der mittels Coulter-Counter bestimmten Wiederfindungsrate berechnet. Auch hierbei ist ein signifikanter Abfall der Wiederfindungsrate der membranintakten Zellpopulation mit Kühlraten ≥ 20 K/min detektierbar (siehe Abbildung 7 und Tabelle 10), übereinstimmend mit den Ergebnissen von Jetter (Jetter, 1998).

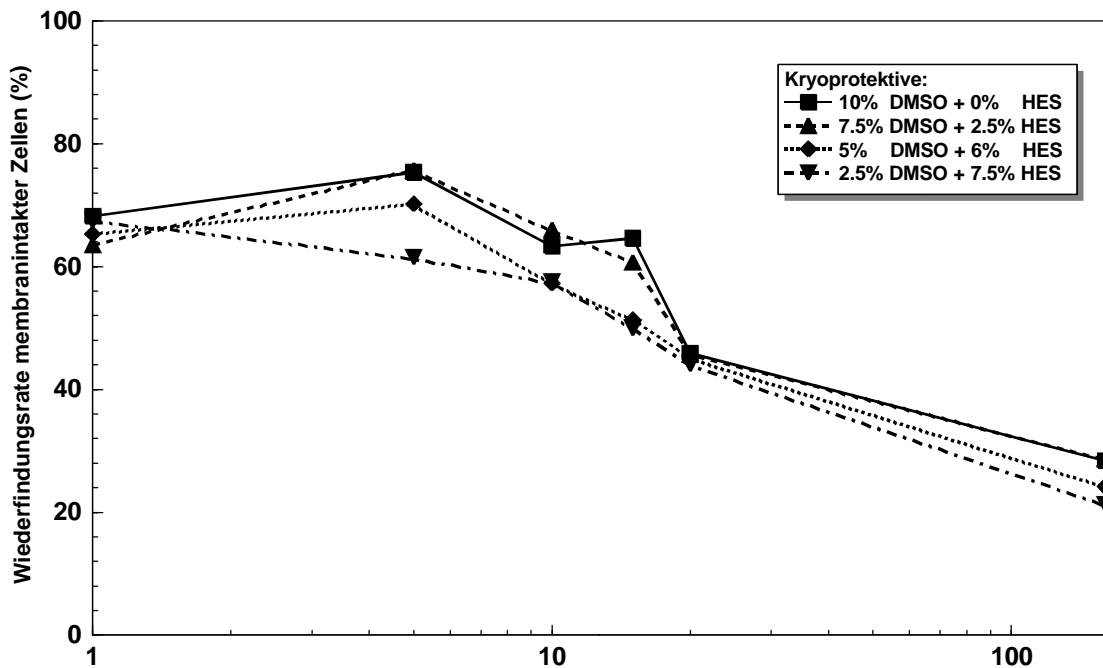


Abb. 7: Wiederfindungsrate membranintakter Zellen [%] (n=8)

Die Kryokonservierungsprotokolle 18 bis 24 (siehe Abschnitt 2.2.2, S.45) waren signifikant verschieden vom „Standardprotokoll“ (1,5 K/min, 10% DMSO).

Tab.10: Mittelwert und Standardabweichung der Wiederfindungsrate membranintakter Zellen [%]

Kryoprotektiv Kühlrate	10% DMSO 0% HES	7,5% DMSO 2,5% HES	5% DMSO 6% HES	2,5% DMSO 7,5% HES
1,5 K/min	68,2 ± 17,7	63,5 ± 19,5	65,3 ± 16,8	67,5 ± 18,2
5 K/min	75,3 ± 16,3	75,7 ± 17,9	70,2 ± 17,1	61,5 ± 17,5
10 K/min	63,3 ± 17,0	66,0 ± 16,9	57,3 ± 15,9	57,5 ± 16,3
15 K/min	64,6 ± 15,4	60,7 ± 17,8	51,3 ± 15,5	50,0 ± 17,6
20 K/min	45,9 ± 16,9	45,7 ± 18,3	45,1 ± 16,3	44,1 ± 14,1
160 K/min	28,4 ± 8,6	28,7 ± 12,8	24,2 ± 9,1	21,3 ± 7,9

3.4 Durchflußzytometrische Analyse der Oberflächenantigene

3.4.1 CD33

Die Expression des Oberflächenantigens CD33 in Prozent wurde durchflußzytometrisch aus der Zellpopulation aller CD45- und CD34-positiven Progenitorzellen ermittelt. Dabei zeigt sich (mit Ausnahme von 2 Protokollen mit der höchsten Kühlrate) unabhängig von der Kühlrate und der Kryoprotektivzusammensetzung kein signifikanter Unterschied in der CD33-Expression (siehe Abbildung 8 und Tabelle 11).

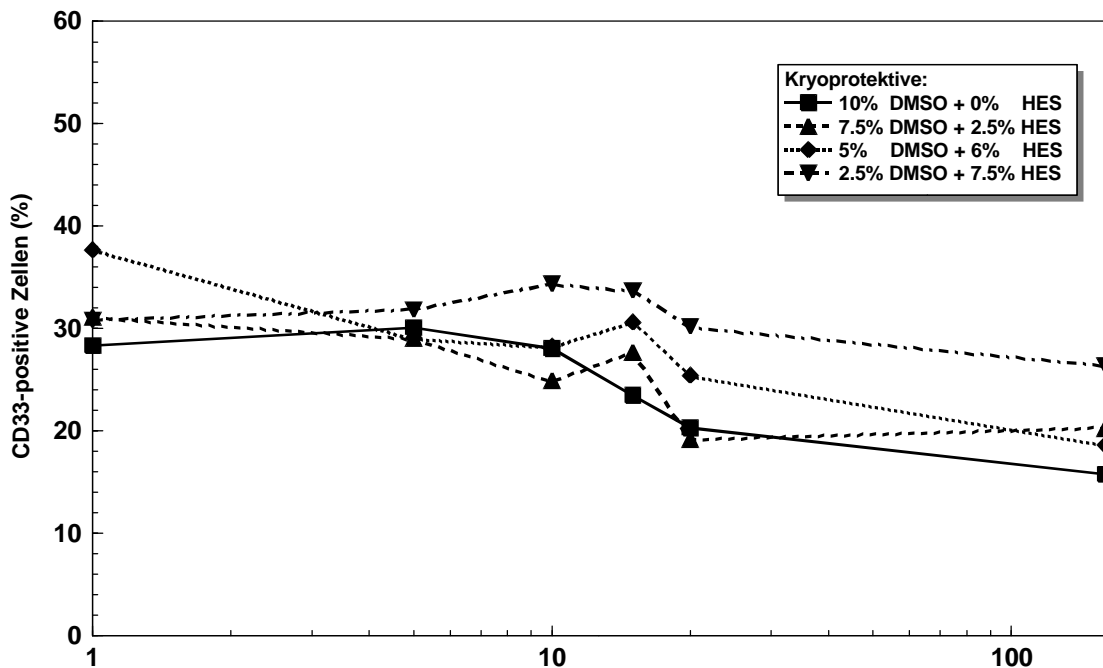


Abb. 8: CD33-positive Zellpopulation [%] (n=8)

Die Kryokonservierungsprotokolle 21 und 23 (siehe Abschnitt 2.2.2, S.45) waren signifikant verschieden vom „Standardprotokoll“ (1,5 K/min, 10% DMSO).

Tab. 11: Mittelwert und Standardabweichung CD33-positiver Zellen [%]

Kryoprotektiv Kühlrate	10% DMSO 0% HES	7,5% DMSO 2,5% HES	5% DMSO 6% HES	2,5% DMSO 7,5% HES
1,5 K/min	28,3 ± 18,5	31,1 ± 20,2	37,7 ± 23,5	30,8 ± 19,0
5 K/min	30,1 ± 24,0	29,1 ± 24,6	29,1 ± 21,3	31,8 ± 19,2
10 K/min	28,1 ± 17,2	24,9 ± 18,5	28,3 ± 21,4	34,4 ± 16,7
15 K/min	23,5 ± 17,6	27,7 ± 25,8	30,6 ± 23,8	33,7 ± 20,2
20 K/min	20,3 ± 15,4	19,2 ± 15,6	25,4 ± 17,9	30,2 ± 19,3
160 K/min	15,8 ± 12,6	20,3 ± 22,0	18,6 ± 15,4	26,4 ± 16,0

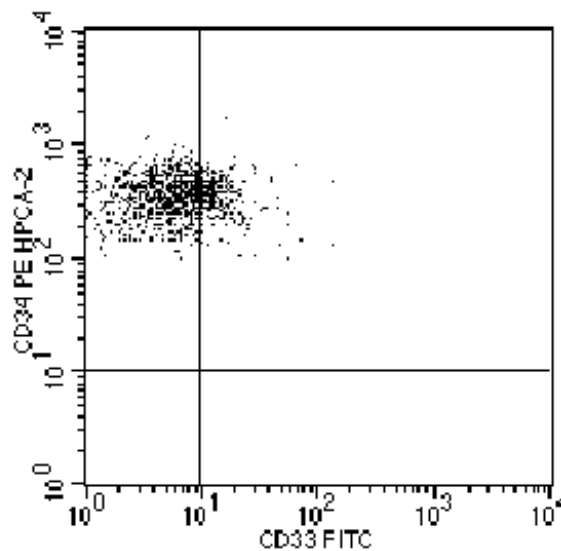


Abb. 9: Beispiel eines Zweiparameter-Punkthistogramms CD33 / CD34

Korrelationsdarstellung der Parameter CD33-FITC (x-Achse, logarithmisch) und CD34-PE (y-Achse, logarithmisch): Darstellung der CD34-exprimierenden Zellen mit CD33-Koexpression (n = 1000).

3.4.2 CD38

In Abbildung 10 sind die Mittelwerte (n = 8) aller CD38-negativen der CD45- und CD34-positiven Zellen in einer Graphik zusammengefasst. Die Tabelle 12 zeigt die dazugehörigen Werte mit der entsprechenden Standardabweichung. Die Zunahme der CD38-negativen Zellpopulation ist nur bei 3 Kryokonservierungsprotokollen signifikant vom „Standardprotokoll“ (10% DMSO, 1,5 K/min) verschieden. Allerdings gibt es hier keinen einheitlichen Trend.

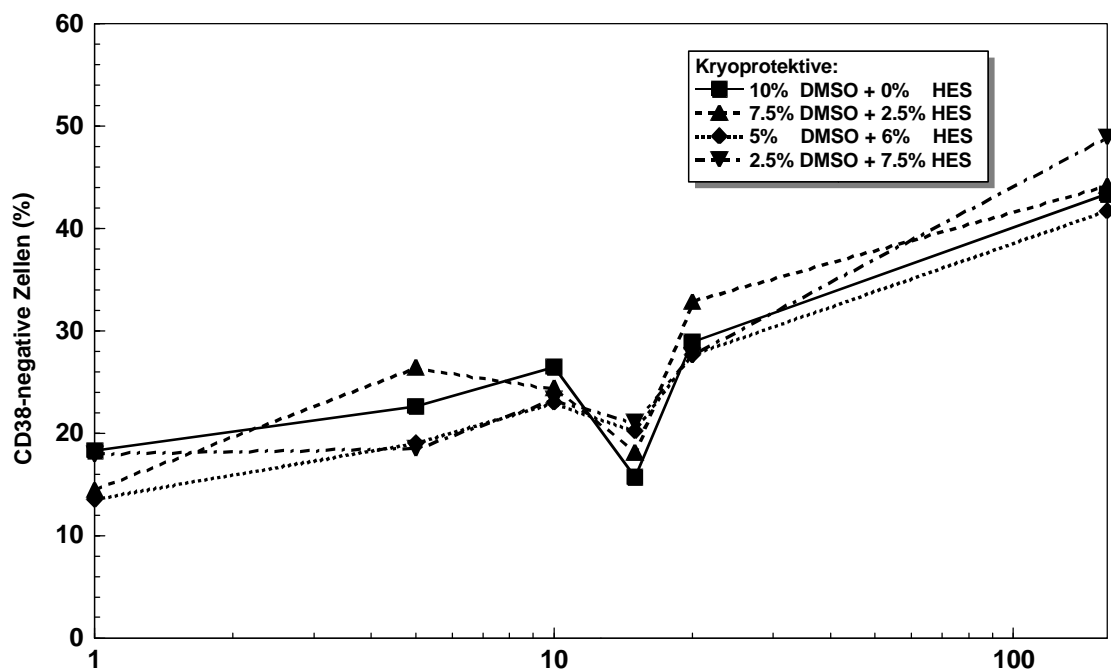


Abb. 10: CD38-negative Zellpopulation [%] (n=8)

Die Kryokonservierungsprotokolle 2, 3 und 24 (siehe Abschnitt 2.2.2, S.45) waren signifikant verschieden vom „Standardprotokoll“ (1,5 K/min, 10% DMSO).

Tab. 12: Mittelwert und Standardabweichung CD38-negativer Zellen [%]

Kryoprotektiv Kühlrate	10% DMSO 0% HES	7,5% DMSO 2,5% HES	5% DMSO 6% HES	2,5% DMSO 7,5% HES
1,5 K/min	18,3 ± 9,4	14,5 ± 9,0	13,6 ± 6,8	17,9 ± 7,0
5 K/min	22,6 ± 11,3	26,5 ± 9,1	19,0 ± 10,7	18,5 ± 6,8
10 K/min	26,4 ± 12,9	24,5 ± 11,7	23,0 ± 13,5	23,3 ± 10,3
15 K/min	15,6 ± 6,8	18,1 ± 12,1	20,2 ± 11,0	21,1 ± 10,9
20 K/min	28,9 ± 16,3	32,9 ± 18,0	27,6 ± 16,0	27,6 ± 8,7
160 K/min	43,3 ± 23,5	44,2 ± 23,8	41,7 ± 23,3	48,9 ± 25,9

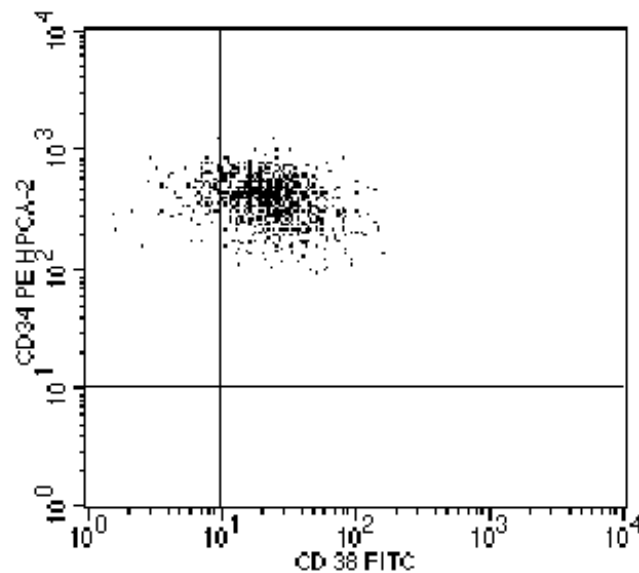


Abb. 11: Beispiel eines Zweiparameter-Punkthistogramms CD38 / CD34

Korrelationsdarstellung der Parameter CD38-FITC (x-Achse, logarithmisch) und CD34-PE (y-Achse, logarithmisch): Darstellung der CD34-exprimierenden Zellen mit fehlender CD38-Koexpression (n = 1000).

3.4.3 CD41a

Mittels Durchflußzytometrie wurde die Expression des Oberflächenantigens CD41a in Prozent von der CD45- und CD34-positiven Zellpopulation bestimmt. In Abbildung 12 sind die Mittelwerte (n = 8) graphisch dargestellt und die entsprechenden Werte mit Standardabweichung in Tabelle 13 zusammengefaßt. Die Expression des CD41a-Antigens war bei 8 der untersuchten Kryokonservierungsprotokolle statistisch signifikant beeinflusst. Bei vorsichtiger Interpretation ließe sich vielleicht sagen, daß hier höhere Kühlraten eher eine Verminderung bewirkten. Das Protokoll 24 verhielt sich allerdings entgegengesetzt.

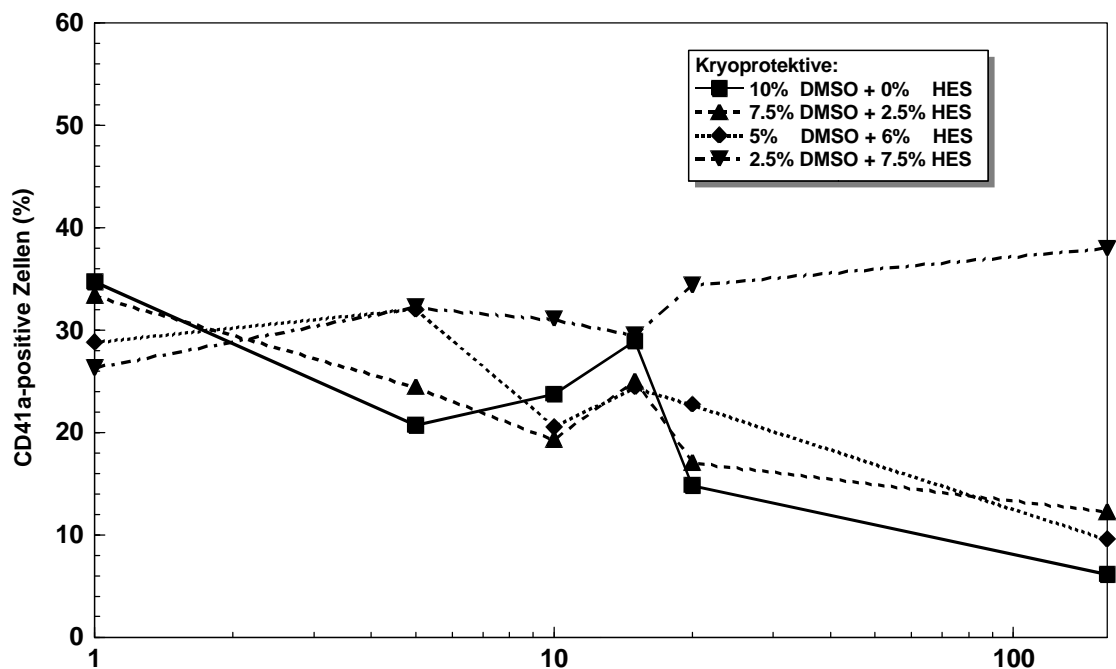


Abb. 12: CD41a-positive Zellpopulation [%] (n=8)

Die Kryokonservierungsprotokolle 10, 11, 17, 18, 19, 21, 22 und 24 (siehe Abschnitt 2.2.2, S.45) waren signifikant verschieden vom „Standardprotokoll“ (1,5 K/min, 10% DMSO).

Tab. 13: Mittelwert und Standardabweichung CD41a-positiver Zellen [%]

Kryoprotektiv Kühlrate	10% DMSO 0% HES	7,5% DMSO 2,5% HES	5% DMSO 6% HES	2,5% DMSO 7,5% HES
1,5 K/min	34,7 ± 13,7	33,4 ± 19,0	28,8 ± 16,4	26,3 ± 15,4
5 K/min	20,7 ± 15,6	24,5 ± 18,5	32,0 ± 14,6	32,3 ± 13,4
10 K/min	23,7 ± 18,5	19,3 ± 10,8	20,5 ± 7,2	31,1 ± 15,4
15 K/min	28,9 ± 19,3	25,0 ± 14,9	24,4 ± 16,2	29,5 ± 14,0
20 K/min	14,8 ± 9,1	17,1 ± 12,2	22,7 ± 12,0	34,4 ± 17,2
160 K/min	6,1 ± 2,4	12,3 ± 15,2	9,6 ± 2,8	38,0 ± 21,7

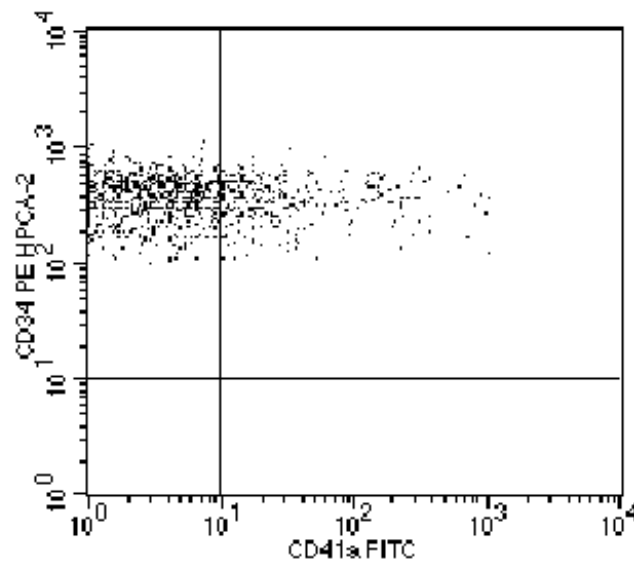


Abb. 13: Beispiel eines Zweiparameter-Punkthistogramms CD41a / CD34

Korrelationsdarstellung der Parameter CD41a-FITC (x-Achse, logarithmisch) und CD34-PE (y-Achse, logarithmisch): Darstellung der CD34-exprimierenden Zellen mit CD41a-Koexpression (n = 1000).

3.4.4 CD_w90

Von allen Zellen, die die Antigene CD45 und CD34 koexprimieren, wurde der prozentuale Anteil der CD_w90-positiven Zellpopulation, graphisch in Abbildung 14 und der Mittelwert und die Standardabweichung in Tabelle 14 (n = 8) dargestellt, durchflußzytometrisch analysiert. In der CD_w90-Expression zeigt sich im wesentlichen kein statistisch signifikanter Unterschied bei den eingesetzten verschiedenen Einfrierprotokollen.

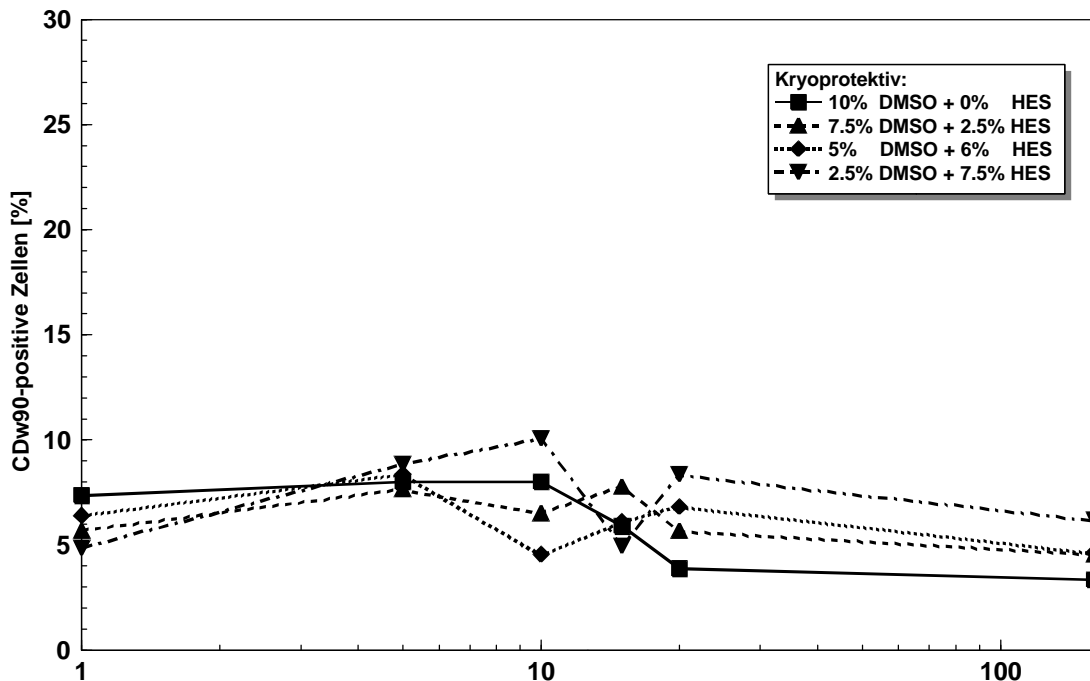
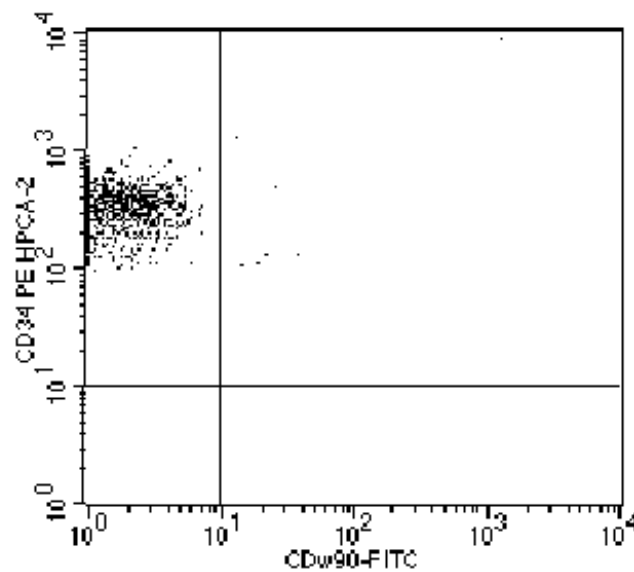


Abb. 14: CD_w90-positive Zellpopulation [%] (n=8)

Nur das Kryokonservierungsprotokoll 22 (siehe Abschnitt 2.2.2, S.45) war signifikant verschieden vom „Standardprotokoll“ (1,5 K/min, 10% DMSO).

Tab. 14: Mittelwert und Standardabweichung CD_w90-positiver Zellen [%]

Kryoprotektiv Kühlrate	10% DMSO 0% HES	7,5% DMSO 2,5% HES	5% DMSO 6% HES	2,5% DMSO 7,5% HES
1,5 K/min	7,4 ± 8,2	5,7 ± 7,7	6,4 ± 6,78	4,9 ± 5,6
5 K/min	8,0 ± 11,8	7,7 ± 8,8	8,4 ± 11,2	8,8 ± 11,9
10 K/min	8,0 ± 8,0	6,5 ± 7,7	4,6 ± 4,8	10,1 ± 9,5
15 K/min	5,9 ± 6,0	7,8 ± 9,7	6,1 ± 6,7	4,6 ± 4,5
20 K/min	3,9 ± 3,1	5,7 ± 6,6	6,8 ± 5,8	8,4 ± 5,3
160 K/min	3,3 ± 3,0	4,6 ± 5,7	4,7 ± 3,3	10,2 ± 4,9

Abb. 15: Beispiel eines Zweiparameter-Punkthistogramms CD_w90 / CD34

Korrelationsdarstellung der Parameter CD_w90-FITC (x-Achse, logarithmisch) und CD34-PE (y-Achse, logarithmisch): Darstellung der CD34-exprimierenden Zellen mit CD_w90-Koexpression (n = 1000).

3.4.5 HLA-DR

Abbildung 16 und Tabelle 15 stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen ($n = 8$) der fehlenden Expression des HLA-DR-Oberflächenantigens, ausgehend von Zellen mit einer CD45- und CD34-Koexpression, dar. Auch hier war im wesentlichen keine statistische Signifikanz der Expressionsänderung nachweisbar.

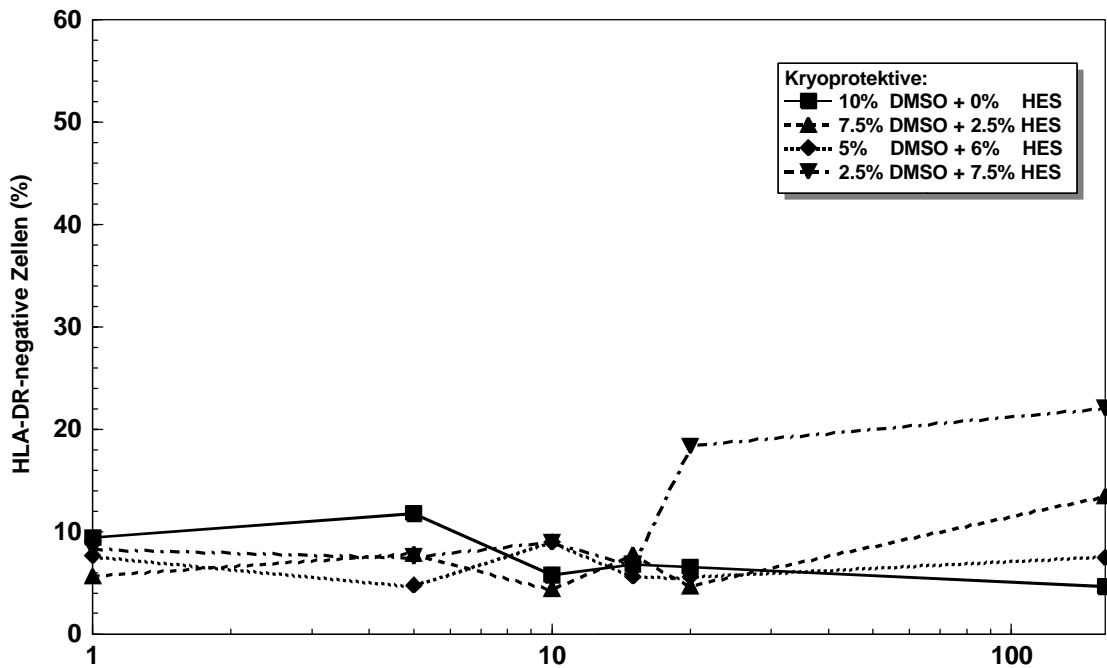


Abb. 16: HLA-DR-negative Zellpopulation [%] ($n=8$)

Nur das Kryokonservierungsprotokoll 20 (siehe Abschnitt 2.2.2, S.45) war signifikant verschieden vom „Standardprotokoll“ (1,5 K/min, 10% DMSO).

Tab. 15: Mittelwert und Standardabweichung HLA-DR-negativer Zellen [%]

Kryoprotektiv Kühlrate	10% DMSO 0% HES	7,5% DMSO 2,5% HES	5% DMSO 6% HES	2,5% DMSO 7,5% HES
1,5 K/min	9,4 ± 10,6	5,9 ± 4,1	7,7 ± 6,4	8,3 ± 8,2
5 K/min	11,8 ± 14,5	7,9 ± 5,6	4,7 ± 3,7	7,6 ± 4,8
10 K/min	5,8 ± 4,7	4,4 ± 2,3	9,0 ± 10,3	9,0 ± 5,8
15 K/min	6,8 ± 6,4	7,8 ± 5,2	5,6 ± 3,7	6,8 ± 5,2
20 K/min	6,5 ± 4,3	4,7 ± 2,5	5,6 ± 4,2	18,4 ± 4,2
160 K/min	4,6 ± 2,4	13,5 ± 11,9	7,5 ± 3,6	22,1 ± 15,3

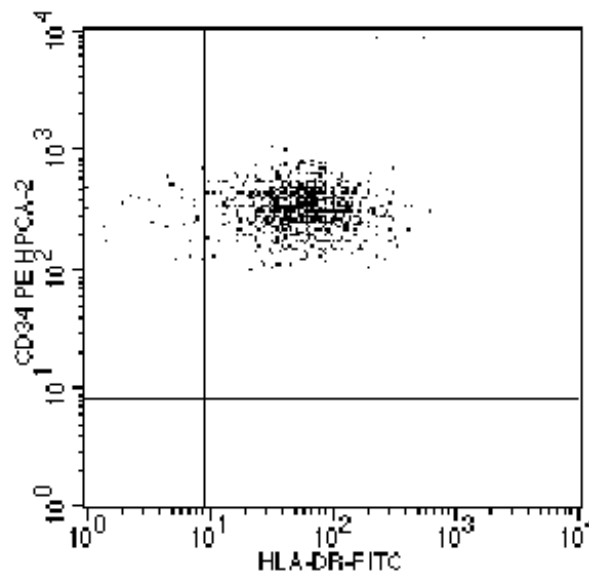


Abb. 17: Beispiel eines Zweiparameter-Punkthistogramms HLA-DR / CD34

Korrelationsdarstellung der Parameter HLA-DR-FITC (x-Achse, logarithmisch) und CD34-PE (y-Achse, logarithmisch): Darstellung der CD34-exprimierenden Zellen mit fehlender HLA-DR-Koexpression (n = 1000).

4 DISKUSSION

Die Kryokonservierung von peripheren hämatopoetischen Progenitorzellen ist heutzutage eine bewährte Methode für die langfristige Lagerung von Aphereseprodukten vor geplanter Reinfusion. Die schädigenden Einflüsse auf die Zellen während der Kryokonservierung sind nur zum Teil erforscht. Die Zellen sind während der Kryokonservierung verschiedenen chemischen und physikalischen Streßfaktoren, z.B. bedingt durch das verwendete Kryoprotektiv, die Kühlrate oder die Lagerungstemperatur, ausgesetzt.

Zur Beurteilung der Effektivität der Kryokonservierung sind Verfahren, die die Vitalität der hämatopoetischen Progenitorzellen bestimmen, notwendig. Dabei wäre es hinsichtlich der Aspekte Zeitersparnis und Praktikabilität wünschenswert, diese Untersuchungen mittels Durchflußzytometrie durchzuführen zu können. Das Verfahren der Zellkultur, in dem die Fähigkeit der Zellen zur Teilung beurteilt wird, benötigt 14 Tage und ist arbeitsintensiver. Die durchflußzytometrische Analyse bietet den Vorteil der raschen Verfügbarkeit der Untersuchungsergebnisse (innerhalb von 3 Stunden) bei relativ geringem Aufwand.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich zum einen mit dem Einfluß zweier Kryoprotektive (DMSO und HES) in unterschiedlichen Konzentrationen sowie verschiedenen Kühlraten auf die Wiederfindungsrate. Zum anderen erfolgte die durchflußzytometrische Untersuchung der Expressionsintensität von verschiedenen Oberflächenantigenen der Progenitorzellen als Funktion der verschiedenen Kryokonservierungsprotokolle. Besonders interessant ist, ob einzelne Zellreihen durch den Kryokonservierungsprozeß stärker als andere beeinflusst werden. Weiterhin könnte klinisch eine Abschätzung des hämatopoetischen Potentials schon kurz nach der Zytapherese erfolgen (Siena, 1991; Serke, 1993). Untersucht wurden 24 verschiedene Einfrierprotokolle, die

in Bezug zum „Standardprotokoll“ (10% DMSO, 1,5 K/min) gesetzt wurden. Mittels Durchflußzytometrie erfolgte die Analyse der Oberflächenantigene CD33, CD34, CD38, CD41a, CD45, CD_w90 und HLA-DR.

Die zahlenmäßige Wiederfindungsrate wurde anhand der Zellzahl der mononukleären Zellen (MNC), mittels Coulter-Counter bestimmt, vor und nach Kryokonservierung berechnet. Die Ergebnisse zeigten eher eine Beeinflussung der Wiederfindungsrate durch zu hohe Kühlraten, nicht jedoch durch die Kryoprotektivzusammensetzung (Abb. 5).

Für das Einfrierprotokoll mit 10% DMSO bei einer Kühlrate von 5 K/min zeigte sich eine Wiederfindungsrate von ca. 80%. Diese Zellwiederfindungsrate wurde auch in anderen Studien, z.B. von Stiff et al. und Jetter (Stiff, 1987; Jetter, 1998) nachgewiesen. Lediglich in der Untersuchung von Galmes et al. betrug die Wiederfindungsrate zwischen 91-96% (5% bis 10% DMSO, kein HES, Kühlrate 5 K/min (Galmes, 1996)). Bei Kühlraten >20 K/min kam es zu einem signifikanten Abfall der Wiederfindungsrate von über 70-80% auf unter 65%. Ähnliche Ergebnisse mit einer Abnahme der Wiederfindungsrate auf unter 60% erlangte Jetter 1998 in einer ähnlichen Versuchsreihe (Jetter, 1998). In Untersuchungen mit CD34-positiven Progenitorzellen zeigte sich nach Donaldson et al. eine signifikante Reduktion der Wiederfindungsrate dieser Zellen bei einer Erhöhung der Kühlrate von 1,5 K/min auf 10 K/min (Donaldson, 1996). Dieser Abfall der Wiederfindungsrate erklärt sich am ehesten durch die letale intrazelluläre Eiskristallisation bei zu hohen Kühlraten.

Im Gegensatz zur Kühlrate hatte die Konzentration und Zusammensetzung des Kryoprotektivs keine wesentlichen Auswirkungen auf die zahlenmäßige Wiederfindungsrate. Zu gleichen Ergebnissen kam Rowley, der 2 Einfrierprotokolle, zum einen 10% DMSO und zum zweiten 5% DMSO mit 6% HES bei gleicher Kühlrate von 1,5 K/min, miteinander verglich. Beide Protokolle unterschieden sich nicht hinsichtlich der Wiederfindungsrate mononukleärer Zellen (Rowley, 1996). Dagegen bewirkte bei Donaldson et al. eine

Reduzierung der DMSO-Konzentration von 5% auf 2,5% bei konstant gehaltener 4%iger HES-Konzentration bei der Kryokonservierung von Stammzellen aus Plazentablut einen Recovery-Abfall von 85,4% auf 12,2% (Donaldson, 1996). Allerdings sei darauf hingewiesen, daß - im Unterschied zur vorliegenden Arbeit - die DMSO-Reduktion nicht von einer gleichzeitigen Erhöhung der HES-Konzentration begleitet wurde.

Die Anzahl der Zellen mit intakter Zellmembran, mittels Trypanblau-Membranintegritätsuntersuchung bestimmt, nahm bei Kühlraten >10 K/min unabhängig von der Kryoprotektivzusammensetzung ab. Ähnliche Ergebnisse wurden von Galmes et al. publiziert (Galmes, 1996). Untersuchungen von Donaldson et al. ergaben bei Kühlraten von 1,5 K/min und 5 K/min membranintakte Progenitorzellen von 93% und 89%. Bei einer Kühlrate von 10 K/min kam es zu einem Abfall der Membranintegrität auf 73% (Donaldson, 1996). Es sei darauf hingewiesen, daß in der vorliegenden Arbeit bei der durchflußzytometrischen Messung möglicherweise auch nicht-vitale Zellen mit in die Analyse einbezogen wurden. Um diese Schwäche zukünftig auszuschalten, käme z.B. die zusätzliche Anfärbung mit 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD), Propidiumjodid (PI) oder LDS-751 in Betracht.

Im wesentlichen war keine signifikante Veränderung der durchflußzytometrisch gemessenen Intensität der Antigenexpression peripherer hämatopoetischer CD34-positiver Progenitorzellen für die Oberflächenantigene CD33, CD38, CD_w90 und HLA-DR bezüglich der Kühlrate, des Kryoprotektivs und dessen Zusammensetzung nachweisbar. Es zeigte sich eher, daß - unabhängig vom untersuchten Antigen - der relative Anteil der jeweiligen Subpopulation weitgehend konstant blieb. Der scheinbare Anstieg des Anteils CD38-negativer Zellen bei höheren Kühlraten (Abb.10) war jedoch statistisch nicht signifikant. Den Einfluß der Kryoprotektivzusammensetzung, insbesondere die Wirkung der HES-Konzentration (6%, 4,5%, 3%, 1,8%, 0%) bei konstanter DMSO-Konzentration (5%), auf die Vitalität mittels Propidiumjodid und Expression des Oberflächenantigens CD38 untersuchten Fitzgerald et al. (Fitzgerald, 1995).

Auch sie fanden, daß die Expression und die Membranintegrität der Zellen unabhängig von der untersuchten HES-Konzentration war.

Der einzige systematische Trend, der in dieser Arbeit gefunden wurde, zeigte sich hinsichtlich der Expression des Oberflächenantigens CD41a in Abhängigkeit von der Kühlrate. Bei Kühlraten >15 K/min nahm die Expression ab, lediglich das Protokoll mit 2,5% DMSO und 7,5% HES machte hier eine Ausnahme (Abbildung 12).

Interessant ist, ob die Antigenexpression durch den Vorgang der Kryokonservierung selbst beeinflusst wird. Bisher durchgeführte Untersuchungen liefern dazu unterschiedliche Ergebnisse. Glassman und Christopher berichteten bereits 1984 von Lymphozyten, deren Expression bestimmter Antigene (CD2, CD3, CD4, CD8 und CD57) vor und nach dem Prozeß der Kryokonservierung unverändert blieb (Glassman, 1984). Hinsichtlich der CD34-Expression und bezüglich des Seitwärtsstreulichts (SSC), d.h. Granularität der Zellen, zeigten sich nach Farley et al. keine signifikanten Unterschiede zwischen Progenitorzellen vor und nach Kryokonservierung (Farley, 1997).

Auf der anderen Seite scheinen einige Untersuchungen einen Hinweis auf die Beeinflussung der Expression bestimmter Oberflächenantigenen durch den Prozeß der Kryokonservierung zu liefern. Eine Studie von Rosillo et al. 1995 zeigte Unterschiede in der Intensität der Expression von Oberflächenantigenen wie CD7, CD13, CD33 und CD34 bei humanen Knochenmarkstammzellen auf. Die Expression der genannten Antigene war bei kryokonserviertem Buffy coat und bei mit DMSO-versetztem Buffy coat im Vergleich zu unbehandeltem Knochenmark verändert. Die Intensität der CD33-Expression nahm bei kryokonservierten und mit DMSO-versetzten Proben im Vergleich zu unbehandelten Zellen ab, wohingegen die Expression des CD19-Antigens intensiviert wurde (Rosillo, 1995).

Eine Abnahme der Expression von L-Selectin (CD62L), welches eine Funktion in der hämatopoetischen Rekonstitution hat, auf humanen CD34-positiven Zellen durch die Kryokonservierung und den Auftauvorgang wurde von Hattori et al. beschrieben (Hattori, 2001). Diese war nach Inkubation der Zellen in Serum über Nacht reversibel. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Koenigsmann et al. (Koenigsmann, 1998) und De Boer et al. (De Boer, 1998). Bereits 1988 berichteten Campos et al. von einem Einfluß der Frier-Tau-Methode auf die Intensität der Expression von Oberflächenantigenen akuter leukämischer Zellen (Campos, 1988). Neben der Membranintegritätsanalyse mit Trypanblau wurden mittels indirekter Immunfluoreszenzuntersuchung akute leukämische Zellen mit den monoklonalen Antikörpern NHL30.5 (Marker für unreife myeloische Zellen), CD15, von reiferen myeloischen Zellen und Granulozyten exprimiert, und CD14 (Expression auf monozytären Zellen) untersucht. Hinsichtlich der Membranintegrität zeigten die Zellen vor und nach Kryokonservierung in Abhängigkeit von der Erkrankung unterschiedliche Ergebnisse, z.B. 98% vor versus 95% nach Kryokonservierung bei akuter myeloischer Leukämie (AML) Typ M1 und 95% vor versus 3% nach Kryokonservierung bei einer AML Typ M3. Diese differierenden Membranintegritäten je nach Leukämieart wurden bereits 1970 durch Bouroncle et al. analysiert (Bouroncle, 1970). Der prozentuale Anteil NHL30.5- und CD14-exprimierender Zellen blieb durch den Frier-Tau-Prozeß unbeeinflusst, wohingegen nur in 60% der Ausgangszellen nach Kryokonservierung das CD15-Antigen detektierbar war. Scheinbar wurden vor allem reifere Subpopulationen durch die Kryokonservierung geschädigt. Die Kryokonservierung peripherer mononukleärer Blutzellen mit 10% DMSO führte zu einer durchflußzytometrisch gemessenen Intensitätsänderung der Oberflächenantigenexpression von Lymphozytensubpopulationen. Im Vergleich zu frischen Blutzellen exprimierten kryokonservierte Lymphozyten zu einem geringeren Prozentsatz $CD8^+$, $CD4^+CD29^+$ und $CD4^+p80^+$, ein Anstieg der Expression war für die Antigene $CD4^+$, $CD19^+$ und $CD4^+CD45RA^+$ nachweisbar (Romeu, 1992).

Neben Kühlrate und Kryoprotektivzusammensetzung gibt es noch weitere Ursachen, die die Expression von Oberflächenantigenen auf Progenitorzellen beeinflussen können, z.B. Lagerungstemperatur oder Lagerungsart. Arseniev et al. testeten zwei Einfrierbeutel (Fresenius- bzw. Gambro) bezüglich der Wiederfindungsrate, der Membranintegrität, des Wachstums in der Zellkultur und anhand einiger Oberflächenantigene (Arseniev, 1995). Große interindividuelle Schwankungen in der Expression der Oberflächenantigene, welche abhängig vom Alter, Geschlecht, Erkrankung und Therapie des Probanden/Patienten ist, machten einen Vergleich der Antigenexpression der Individuen untereinander jedoch unmöglich.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die autologe Stammzelltransplantation wird heutzutage hauptsächlich in der Therapie von hämatologischen Erkrankungen eingesetzt (best. Leukämien, Non-Hodgkin-Lymphome, Morbus Hodgkin und Plasmocytom). Die hämatopoetischen Progenitorzellen werden aus dem Knochenmark in das periphere Blut mobilisiert, mittels Apherese gewonnen und bis zur Reinfusion mittels Kryokonservierung gelagert. Hierfür findet meist das Kryoprotektiv Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentration von 10% und eine Kühlrate von 1,5 K/min Verwendung. Eine Alternative stellt das Protokoll mit 5% DMSO und 6% Hydroxyethylstärke (HES) dar.

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Einfluß von Kühlrate und Kryoprotektivzusammensetzung auf die Expression von Oberflächenantigenen peripherer hämatopoetischer Progenitorzellen nach dem Prozeß der Kryokonservierung untersucht. Dafür fanden 24 Einfrierprotokolle Verwendung: Die Kühlraten betragen 1,5, 5, 10, 15, 20, 160 K/min und die Kryoprotektive DMSO und HES wurden im folgenden Verhältnis eingesetzt: 10/0, 7,5/2,5, 5/6, 2,5/7,5 (%/%). Nach dem Frier-Tau-Vorgang wurden die CD34-positiven Progenitorzellen hinsichtlich der Oberflächenantigene CD33, CD34, CD38, CD41a, CD45, CD_w90 und HLA-DR durchflußzytometrisch untersucht. Alle Einfrierprotokolle wurde mit dem Standardprotokoll (10% DMSO, 1,5 K/min) verglichen. Aliquots der Leukaphereseprodukte von 7 Patienten mit hämatologischen Erkrankungen und soliden Tumoren und von 1 Spender wurden nach Stimulation mit dem Wachstumsfaktor G-CSF in einer Konzentration von 10-24 µg/kg über 5 Tage mittels der o.g. 24 Einfrierprotokolle untersucht. Das Apheresat wurde im Verhältnis 1:2 mit der Kryoprotektivlösung gemischt. Die Kühlraten 1,5, 10 und 15 K/min wurden mit dem Gerät KRYO 10-16 eingestellt, 5 K/min wurde mittels einem -80°C-Kühlschrank, 20 K/min durch Konservierung in der Dampfphase und 160 K/min durch direktes Eintauchen der Probe in

flüssigen Stickstoff erreicht. Aufgetaut wurden die Zellsuspensionen in einem 37°C-warmen Wasserbad und zweimal zur Kryoprotektiventfernung gewaschen. Die Wiederfindungsrate der mono-nukleären Zellen wurde am Coulter-Counter bestimmt. Die einzelnen Proben wurden mit monoklonalen Antikörpern inkubiert, die Erythrozytenlyse erfolgte mit Ammoniumchlorid. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer wurden die Zellen am Durchflußzytometer analysiert. Die Oberflächenantigene der hämatopoetischen Progenitorzellen charakterisieren die Differenzierung und Linienzugehörigkeit einer CD34-positiven Zelle. Frühe, sehr unreife CD34-positive Progenitorzellen zeichnen sich durch das Fehlen von CD38- und HLA-DR aus. Das CD33-Antigen ist das erste nachweisbare Oberflächenantigen der myeloischen Reihe. Eine CD41a-Koexpression assoziiert eine Linienzugehörigkeit zu der megakaryozytären Reihe. CD45 ermöglichte eine Differenzierung zwischen Leukozyten und Debris. Pro Messung wurden 1000 CD34-positive Zellen mit CD45-Koexpression hinsichtlich der Subpopulationen untersucht.

Es zeigte sich, daß die zahlenmäßige Wiederfindungsrate eher abhängig von der Kühlrate als von der Kryoprotektivzusammensetzung ist. Bei Kühlraten oberhalb von 20 K/min kam es zu einem signifikanten Abfall (Abb. 5), der sich auch in der Membranintegritätsbestimmung mittels Trypanblau bereits bei Kühlraten oberhalb von 10 K/min fand (Abb. 6). Dagegen hatten die Kühlrate und die Kryoprotektivzusammensetzung im wesentlichen keinen Einfluß auf die Expression der Oberflächenantigene CD33 (Abb. 8), CD41a (Abb. 12), CD_w90 (Abb. 14) und HLA-DR (Abb. 16).

Fazit: Das „Standardprotokoll“ mit 10% DMSO und einer Kühlrate von 1,5 K/min ist eine geeignete Methode zur Kryokonservierung peripherer hämatopoetischer Progenitorzellen sowohl hinsichtlich der Expression von Oberflächenantigenen als auch der zahlenmäßigen Wiederfindungsrate membranintakter Zellen.

6 ANHANG

Im Anhang sind die Meßwerte einzelnen Kryokonservierungsprotokolle (KP) 1-24 (siehe Tabelle 16) der verschiedenen Patienten (A bis H) dargestellt.

Weiterhin wurden Mittelwert (Mw), Standardabweichung (Sw), Medianwert (Med), Maximum (Max), Minimum (Min) und Variationskoeffizient (VK) berechnet. Die Abkürzung „n.b.“ steht für nicht bestimmt.

Tab. 16: Protokolle zur Kryokonservierung (KP)

Kühlrate	10% DMSO 0% HES	7,5% DMSO 2,5% HES	5% DMSO 6% HES	2,5% DMSO 7,5% HES
1,5 K/min	1	2	3	4
5 K/min	5	6	7	8
10 K/min	9	10	11	12
15 K/min	13	14	15	16
20 K/min	17	18	19	20
160 K/min	21	22	23	24

Anhang 1: Wiederfindungsrate [%]

KP	A	B	C	D	E	F	G	H	Mw	Sw	Med	Max	Min	VK
1	79,4	69,0	74,2	78,1	53,1	66,9	70,5	81,3	72,2	9,6	72,3	81,3	53,1	13,2
2	81,0	61,8	68,9	49,6	78,6	65,5	59,7	85,8	68,9	12,2	67,2	85,8	49,6	17,7
3	87,3	62,1	61,8	58,9	64,5	64,4	75,9	82,0	69,6	10,7	64,4	87,4	58,9	15,4
4	84,8	70,7	80,4	57,7	76,9	71,9	75,8	83,5	75,2	8,7	76,3	84,8	57,7	11,6
5	86,7	70,3	85,6	n.b.	74,0	73,5	78,7	93,5	80,3	8,5	78,7	93,5	70,3	10,6
6	88,9	66,3	94,7	n.b.	72,9	68,9	84,8	83,1	80,0	10,7	83,1	88,9	66,3	13,4
7	85,2	57,6	71,3	n.b.	73,8	69,7	82,6	81,8	74,6	9,6	73,8	85,2	57,6	12,9
8	83,7	66,0	66,4	n.b.	73,5	56,7	78,3	78,0	71,8	9,3	73,5	83,7	56,7	13,0
9	82,2	47,5	76,4	n.b.	54,1	73,2	75,5	83,6	70,3	14,0	75,5	83,6	47,5	20,0
10	85,4	65,6	81,1	59,2	66,2	75,2	67,0	86,7	73,3	10,3	71,1	86,7	59,2	14,1
11	75,5	59,8	68,9	58,4	n.b.	66,5	66,7	73,6	67,0	6,4	66,7	75,5	58,4	9,5
12	76,0	61,3	62,4	62,2	52,9	73,5	73,1	70,7	66,5	8,0	66,6	76,0	52,9	12,0
13	89,3	70,3	83,6	n.b.	79,7	65,4	80,7	76,2	77,9	8,0	79,7	89,3	65,4	10,3
14	77,2	75,6	83,8	n.b.	72,6	61,8	75,2	94,2	77,2	10,0	75,6	94,2	61,8	9,1
15	83,7	66,2	71,1	n.b.	74,7	68,9	81,0	79,3	75,0	6,6	74,7	83,7	66,2	8,8
16	n.b.	64,0	90,0	n.b.	n.b.	71,2	84,6	74,9	77,0	10,4	74,9	90,0	64,0	9,1
17	77,7	74,3	77,3	62,7	59,0	54,1	72,1	81,1	69,8	9,9	73,2	81,1	59,0	14,2
18	85,3	61,0	70,7	68,6	59,8	61,4	67,0	82,4	69,5	9,7	67,8	85,3	59,8	14,0
19	79,8	77,1	82,0	53,3	65,6	53,6	59,5	80,5	68,9	12,4	71,4	82,0	53,3	18,0
20	73,7	62,1	73,8	53,0	68,7	63,2	79,6	78,4	69,1	9,1	71,2	79,6	53,0	13,2
21	52,5	50,9	56,2	n.b.	38,8	41,5	54,4	52,9	49,6	6,7	52,5	56,2	38,8	13,5
22	62,5	53,3	63,6	n.b.	47,7	46,9	42,5	62,5	54,1	8,8	53,3	63,6	42,5	16,3
23	58,9	53,1	56,7	n.b.	41,5	48,8	50,6	77,1	55,2	11,2	53,1	77,1	41,5	20,3
24	32,4	50,4	63,8	n.b.	47,0	52,4	47,9	62,0	50,8	10,5	50,4	63,8	32,4	20,7

Anhang 2: Membranintegrität [%]

K P	A	B	C	D	E	F	G	H	Mw	Sw	Med	Max	Min	VK
1	98,8	88,5	92,2	94,0	86,4	99,0	98,1	95,3	94,3	8,9	94,7	99,0	86,4	9,4
2	93,2	89,2	89,9	97,7	92,6	88,7	94,0	96,1	92,2	4,5	92,9	97,7	88,7	4,9
3	88,3	90,1	92,2	98,2	86,3	98,8	99,0	91,7	93,8	5,6	92,9	99,0	86,3	6,0
4	90,3	84,8	86,9	92,2	94,1	90,5	89,8	87,2	89,8	3,6	90,1	94,1	84,4	4,0
5	92,2	87,1	85,1	n.b.	98,9	95,1	90,7	96,0	93,7	6,9	92,2	98,8	85,1	7,4
6	95,4	87,5	91,5	n.b.	96,7	89,9	97,7	98,2	94,7	8,9	95,4	98,2	87,5	9,4
7	96,0	94,2	91,7	n.b.	89,3	94,3	91,8	97,6	94,1	2,9	94,2	97,6	89,3	3,1
8	90,1	82,2	79,5	n.b.	88,5	77,9	91,1	85,5	85,7	6,3	85,5	91,1	77,9	7,4
9	89,9	79,8	95,2	n.b.	92,2	86,7	88,3	93,3	90,9	8,2	89,9	95,2	79,8	8,3
10	78,3	85,2	95,6	88,4	97,9	75,3	98,9	89,9	90,0	11,4	89,2	98,8	75,3	12,6
11	83,5	79,2	77,4	89,8	92,2	86,4	87,3	84,0	85,5	4,8	85,2	92,2	77,4	5,6
12	82,1	75,2	77,4	91,8	88,9	88,4	93,7	82,2	86,4	7,7	85,3	93,7	75,2	8,9
13	84,2	82,7	83,5	88,5	79,4	77,3	82,6	83,0	82,9	2,8	82,9	88,5	77,3	3,4
14	92,2	82,5	68,7	n.b.	74,8	83,6	81,1	75,3	78,7	8,9	81,1	92,2	68,7	11,3
15	65,2	59,9	80,3	n.b.	73,4	59,6	66,3	62,8	68,4	6,1	65,2	80,3	59,6	8,9
16	n.b.	65,5	59,3	n.b.	n.b.	72,1	68,9	60,9	65,0	5,9	65,5	72,1	59,3	9,1
17	68,3	72,6	55,8	58,3	66,7	73,0	77,8	59,9	65,8	10,1	67,5	77,8	55,8	15,3
18	55,7	53,0	77,8	65,0	80,1	71,0	58,9	60,8	65,7	9,9	62,9	77,8	53,0	15,1
19	53,8	49,5	80,3	66,9	79,1	65,2	57,7	61,1	65,4	11,3	63,2	80,3	49,5	17,3
20	48,7	67,3	75,3	65,8	57,0	53,1	73,9	63,9	63,8	12,3	64,9	75,3	48,7	19,3
21	74,2	68,2	46,5	n.b.	51,9	69,0	65,0	49,3	58,4	14,5	65,0	74,2	46,5	24,8
22	66,9	68,3	52,0	n.b.	47,3	50,3	55,5	49,8	53,1	6,9	52,0	68,3	47,3	13,0
23	48,8	33,9	55,8	n.b.	53,9	35,7	35,8	49,7	43,8	13,9	48,8	55,8	33,9	31,7
24	29,7	44,8	51,8	n.b.	46,8	33,1	39,3	50,0	41,9	15,9	44,8	51,8	29,7	37,9

Anhang 3: Wiederfindungsrate membranintakter Zellen [%]

K P	A	B	C	D	E	F	G	H	Mw	Sw	Med	Max	Min	VK
1	55,2	78,4	73,9	54,2	49,7	80,0	55,9	79,1	68,2	17,7	64,9	80,0	49,7	25,9
2	71,0	62,9	52,9	46,8	44,8	75,5	80,1	49,9	63,5	19,5	57,9	80,1	44,8	30,7
3	68,1	74,8	44,1	53,0	77,3	72,1	56,0	49,3	65,3	16,8	62,1	77,3	44,1	25,7
4	77,4	66,2	43,9	51,9	79,6	76,6	54,0	48,8	67,5	18,2	60,1	79,6	43,9	27,0
5	83,8	88,5	52,8	n.b.	53,1	88,8	79,0	59,7	75,3	16,3	79,0	88,8	52,8	21,6
6	54,9	86,4	89,0	n.b.	56,8	87,6	83,2	53,0	75,7	17,9	83,2	89,0	53,0	23,6
7	56,8	81,7	79,3	n.b.	76,0	68,1	61,3	55,3	70,2	17,1	68,1	81,7	55,3	24,4
8	54,1	46,8	77,5	n.b.	79,8	43,8	68,9	59,6	61,5	17,5	59,6	79,8	43,8	28,4
9	69,8	54,6	47,4	n.b.	77,8	45,0	69,8	51,8	63,3	17,0	54,6	77,8	47,4	26,9
10	72,2	53,7	45,7	69,8	79,8	49,7	73,3	53,6	66,0	16,9	61,8	79,8	45,7	25,6
11	67,3	51,0	40,9	65,8	72,9	44,7	69,2	44,1	57,3	15,9	58,4	72,9	40,9	27,7
12	65,7	53,4	41,9	68,2	74,8	44,1	62,8	51,0	57,5	16,3	58,1	74,8	41,9	28,3
13	68,7	55,7	46,1	n.b.	79,8	47,3	65,0	75,8	64,6	15,4	65,0	75,8	46,1	23,8
14	65,2	56,8	44,3	n.b.	74,3	52,0	55,8	69,7	60,7	17,8	56,8	74,3	44,3	29,3
15	47,3	51,1	54,8	n.b.	71,8	41,8	49,9	68,7	51,3	15,5	51,1	71,8	41,8	30,2
16	n.b.	41,1	44,2	n.b.	n.b.	69,0	67,7	51,7	50,0	17,6	51,7	69,0	41,1	35,2
17	38,5	41,9	35,9	60,5	59,5	33,8	50,7	43,8	45,9	16,9	42,9	60,5	33,8	36,8
18	36,8	39,7	31,1	57,3	65,0	30,5	44,0	31,4	45,7	18,3	38,3	65,0	30,5	40,0
19	28,2	35,8	58,9	66,1	33,3	52,2	31,8	43,8	45,1	16,3	39,8	66,1	28,2	36,1
20	27,6	53,0	34,4	43,1	33,8	62,1	32,0	46,8	44,1	14,1	38,8	62,1	27,6	32,0
21	22,6	31,9	35,8	n.b.	19,9	24,5	32,7	38,3	28,4	8,6	31,9	38,3	19,9	30,3
22	17,8	33,4	29,2	n.b.	21,1	32,6	39,1	17,5	28,7	12,8	29,2	39,1	17,5	44,6
23	23,7	35,6	39,6	n.b.	18,7	21,9	28,9	19,7	24,2	9,1	23,7	39,6	18,7	37,6
24	15,7	23,0	27,8	n.b.	31,9	28,7	18,2	17,9	21,3	7,9	23,0	31,9	15,5	37,1

Anhang 4: CD33-positive Zellpopulation [%] von CD45⁺ /CD34⁺

K P	A	B	C	D	E	F	G	H	Mw	Sw	Med	Max	Min	VK
1	4,1	28,9	59,2	43,5	22,6	30,5	27,6	12,5	28,3	18,5	28,2	59,2	4,1	65,4
2	1,3	40,3	66,7	46,8	20,7	30,9	26,2	16,0	31,1	20,2	28,6	66,7	1,3	64,9
3	1,6	64,0	68,3	58,6	30,1	31,3	26,4	21,1	37,7	23,5	30,7	68,3	1,6	62,3
4	3,3	41,3	57,4	53,8	23,4	32,6	15,7	19,0	30,8	19,0	28,0	57,4	3,3	61,7
5	2,1	66,1	60,4	n.b.	22,7	26,9	17,6	14,8	30,1	24,0	22,7	60,4	2,1	79,7
6	5,5	66,4	62,3	n.b.	16,6	15,5	16,0	21,1	29,1	24,6	16,6	66,4	5,5	84,5
7	3,2	15,3	71,9	n.b.	28,6	30,3	29,7	24,6	29,1	21,3	28,6	71,9	3,2	73,2
8	4,1	50,9	61,3	n.b.	33,6	20,6	28,4	24,0	31,8	19,2	28,4	50,9	4,1	60,4
9	8,3	42,9	60,7	31,3	25,6	26,6	14,2	14,8	28,0	17,2	26,1	60,7	8,3	61,4
10	8,3	55,9	51,2	25,0	20,7	14,8	9,1	14,4	24,9	18,5	17,8	55,9	8,3	74,3
11	4,2	68,5	35,2	38,1	n.b.	22,3	15,4	14,1	28,3	21,4	22,3	68,5	4,2	75,6
12	7,6	35,0	59,7	32,3	23,1	46,7	47,6	23,0	34,4	16,7	33,7	59,7	7,6	48,5
13	4,8	55,5	38,7	n.b.	14,9	22,5	14,0	13,9	23,5	17,6	14,9	55,5	4,8	74,9
14	3,1	66,0	63,1	n.b.	12,1	17,4	21,0	11,1	27,7	25,8	17,4	66,0	3,1	93,1
15	1,8	67,8	57,6	n.b.	25,3	28,6	19,4	13,7	30,6	23,8	25,3	67,8	1,8	77,8
16	n.b.	62,1	47,8	n.b.	n.b.	20,7	16,1	21,7	33,7	20,2	21,7	62,1	16	59,9
17	4,1	32,2	51,9	22,1	11,9	16,6	8,1	15,4	20,3	15,4	16,0	51,9	4,1	75,9
18	2,0	37,1	47,3	17,9	9,8	13,5	5,9	19,9	19,2	15,6	15,7	47,3	2,0	81,3
19	6,6	47,1	56,1	32,3	15,6	14,8	18,8	12,0	25,4	17,9	17,2	56,1	6,6	70,5
20	7,4	67,7	40,3	35,4	32,1	8,0	24,1	26,7	30,2	19,3	29,4	67,7	7,4	63,9
21	4,8	29,4	37,7	n.b.	13,5	7,4	8,4	9,3	15,8	12,6	9,3	37,7	4,8	79,7
22	1,9	47,9	56,1	n.b.	10,2	10,0	5,6	10,1	20,3	22,0	10,1	56,1	1,9	108,4
23	5,4	11,4	52,4	n.b.	15,3	17,5	16,2	12,2	18,6	15,4	15,3	52,4	5,4	82,8
24	8,9	22,4	52,0	n.b.	44,3	12,1	21,3	23,8	26,4	16,0	22,4	52,0	8,9	60,6

Anhang 5: CD38-negative Zellpopulation [%] von CD45⁺ /CD34⁺

K P	A	B	C	D	E	F	G	H	Mw	Sw	Med	Max	Min	VK
1	18,1	26,4	25,9	12,6	10,6	28,7	4,8	29,6	18,3	9,4	22,0	29,6	4,8	51,4
2	15,2	9,2	10,3	10,3	8,1	30,0	6,1	26,5	14,5	8,9	10,3	30,0	8,1	61,4
3	15,9	9,8	11,5	8,6	9,2	21,2	6,6	25,6	13,5	6,8	10,6	25,6	8,6	50,4
4	12,9	14,7	12,6	10,4	25,5	25,3	14,5	27,7	17,9	7,0	14,6	27,7	10,4	39,1
5	33,3	7,0	14,6	n.b.	25,4	27,4	13,1	37,5	22,6	11,3	25,4	37,5	7,0	50,0
6	36,1	22,8	8,4	n.b.	26,5	27,1	31,1	33,2	26,5	9,1	27,1	36,1	8,4	34,3
7	34,6	12,7	7,7	n.b.	15,6	25,4	7,9	29,2	19,0	10,7	15,6	34,6	7,7	56,3
8	27,8	16,5	13,5	n.b.	9,7	25,7	14,1	22,3	18,5	6,8	16,5	27,8	9,7	36,8
9	30,8	21,1	9,2	27,2	22,1	31,6	17,1	52,5	26,4	12,9	24,7	52,5	9,2	48,8
10	25,4	8,4	9,1	23,7	27,3	37,0	23,2	41,5	24,4	11,7	24,6	41,5	8,4	47,9
11	27,6	4,0	10,3	23,2	n.b.	32,7	19,1	44,2	23,0	13,6	23,2	44,2	4,0	59,4
12	24,6	7,3	28,0	12,9	33,1	33,3	32,4	14,8	23,3	10,3	26,3	33,3	7,3	44,2
13	22,4	8,8	7,0	n.b.	18,4	19,8	10,4	23,0	15,7	6,8	18,4	23,0	7,0	43,3
14	10,8	6,9	12,0	n.b.	21,7	30,2	7,5	37,8	18,1	12,1	12,0	30,2	6,9	66,9
15	25,1	5,7	10,4	n.b.	28,8	29,3	10,3	32,0	20,2	11,0	25,1	32,0	5,7	54,5
16	n.b.	18,1	9,5	n.b.	n.b.	34,7	13,0	30,1	21,1	10,9	18,1	34,7	9,5	51,7
17	28,5	8,5	4,4	31,3	34,8	42,0	27,8	53,8	28,9	16,3	29,9	53,8	8,5	56,4
18	43,3	8,3	6,4	23,6	40,4	51,7	38,1	51,1	32,9	18,0	39,3	51,1	6,4	54,7
19	35,3	12,5	7,7	12,7	36,9	39,1	23,7	53,2	27,6	16,0	29,5	53,2	7,7	57,9
20	37,2	32,1	16,1	14,4	33,8	35,4	27,3	24,6	27,6	8,7	29,7	37,2	14,4	31,5
21	63,6	14,0	7,0	n.b.	55,3	60,2	43,1	60,2	43,3	23,5	55,3	63,6	7,0	54,3
22	52,7	17,2	5,6	n.b.	63,7	49,9	50,0	70,1	44,2	23,8	50,0	63,7	5,6	53,8
23	64,9	14,8	7,4	n.b.	65,9	43,0	39,0	56,9	41,7	23,3	43,0	65,9	7,4	55,9
24	100,0	25,6	27,3	n.b.	59,4	44,3	32,8	53,0	48,9	25,9	44,3	100,0	25,7	52,9

Anhang 6: CD41a-positive Zellpopulation [%] von CD45⁺ /CD34⁺

K P	A	B	C	D	E	F	G	H	Mw	Sw	Med	Max	Min	VK
1	46,8	37,0	57,5	21,8	26,8	17,8	33,3	19,7	34,7	13,7	30,1	57,5	17,8	39,5
2	35,6	51,6	71,2	16,3	26,6	18,1	24,1	23,7	33,4	19,0	25,3	71,2	16,3	56,9
3	28,5	44,6	60,8	16,1	27,0	12,0	24,8	16,8	28,8	16,4	25,9	60,8	16,1	56,9
4	27,5	31,7	59,2	10,1	23,5	14,1	15,3	29,3	26,3	15,4	25,5	59,2	10,1	58,6
5	15,8	50,5	33,1	n.b.	7,4	10,4	16,9	10,8	20,7	15,6	15,8	50,5	7,4	75,3
6	20,9	51,2	50,6	n.b.	10,9	8,5	15,0	14,2	24,5	18,5	15,0	50,6	8,5	75,5
7	27,9	49,5	51,0	n.b.	19,8	13,9	38,4	23,6	32,0	14,6	27,9	51,0	13,9	45,6
8	17,2	43,4	53,7	n.b.	18,8	26,3	38,2	28,3	32,3	13,4	28,3	53,7	17,2	41,5
9	14,9	66,7	33,2	17,1	14,1	17,2	12,9	13,8	23,7	18,5	16,0	66,7	17,2	78,1
10	19,3	36,0	36,5	14,3	11,6	11,2	10,4	15,4	19,3	10,8	14,9	36,5	10,4	55,9
11	28,2	24,5	31,1	14,9	n.b.	14,0	14,6	16,3	20,5	7,2	16,3	31,1	14,0	35,1
12	28,8	23,8	65,0	13,1	29,3	21,9	29,6	37,3	31,1	15,4	29,1	65,0	13,1	49,5
13	21,1	57,8	52,2	n.b.	11,1	18,5	48,5	16,5	28,9	19,3	21,1	57,8	11,1	66,5
14	34,8	50,7	68,2	n.b.	13,1	14,5	21,6	15,4	25,0	14,9	21,6	68,2	13,1	59,6
15	26,0	55,9	42,7	n.b.	18,1	10,7	16,9	19,0	24,4	16,2	19,0	55,9	18,1	66,4
16	n.b.	45,2	42,4	n.b.	n.b.	14,6	17,2	28,2	29,5	14,0	28,2	45,2	14,6	47,4
17	20,9	23,6	31,1	6,0	9,5	9,1	8,6	9,8	14,8	9,1	9,7	31,1	6,0	61,5
18	12,3	27,2	42,9	7,9	13,5	8,7	7,8	16,3	17,1	12,2	12,9	42,9	7,9	71,3
19	19,8	42,4	41,1	16,7	16,2	11,1	18,6	16,1	22,7	12,0	17,6	42,4	16,1	52,9
20	49,5	59,1	41,6	18,1	49,1	17,4	21,7	18,5	34,4	17,2	31,7	59,1	17,4	50,0
21	9,6	6,4	20,0	n.b.	7,9	2,7	4,8	5,3	6,1	2,4	6,4	20,0	2,7	39,3
22	5,4	43,0	53,1	n.b.	4,7	4,0	9,8	6,7	12,3	15,2	6,7	53,1	5,4	123,0
23	8,4	14,3	30,8	n.b.	8,7	7,3	7,1	11,7	9,6	2,8	8,7	30,8	7,1	29,2
24	25,0	68,6	15,2	n.b.	51,7	10,0	48,1	24,4	38,0	21,7	25,0	68,6	10,0	57,1

Anhang 7: CDw90-positive Zellpopulation [%] von CD45⁺ /CD34⁺

KP	A	B	C	D	E	F	G	H	Mw	Sw	Med	Max	Min	VK
1	2,4	21,1	15,8	1,1	0,9	2,1	8,4	1,7	7,4	8,2	2,3	21,1	1,1	110,8
2	0,9	10,3	22,7	1,6	0,6	2,2	6,0	1,1	5,7	7,7	1,9	22,7	0,6	135,1
3	0,9	14,0	19,5	2,0	2,7	5,9	4,7	1,5	6,4	6,8	3,7	19,5	0,9	106,3
4	1,2	12,6	15,1	1,0	1,9	2,7	2,7	1,7	4,9	5,6	2,3	15,1	1,0	114,3
5	1,7	33,3	12,4	n.b.	0,6	2,0	2,9	3,1	8,0	11,8	2,9	33,3	0,6	121,1
6	3,0	20,5	20,4	n.b.	2,1	2,0	3,9	1,7	7,7	8,8	3,0	20,5	1,7	114,3
7	2,6	11,0	32,6	n.b.	1,8	2,6	6,6	1,4	8,4	11,2	2,6	32,6	1,4	133,3
8	1,3	34,5	11,5	n.b.	1,0	5,6	5,8	2,1	8,8	11,9	5,6	34,5	1,0	135,2
9	4,2	24,0	16,8	5,0	4,9	5,6	1,7	1,8	8,0	8,0	5,0	24,0	1,7	100,0
10	3,0	24,2	11,0	4,2	3,3	1,9	2,0	2,6	6,5	7,7	3,2	24,2	2,0	118,5
11	2,0	13,3	9,4	2,0	n.b.	1,9	1,3	1,9	4,5	4,8	2,0	13,3	1,3	106,7
12	2,5	16,6	29,5	1,9	8,8	7,7	12,3	1,5	10,1	9,5	8,2	29,5	1,5	90,5
13	3,4	16,9	11,4	n.b.	1,7	5,1	1,8	1,0	5,9	6,0	3,4	16,9	1,0	101,7
14	1,1	16,2	25,6	n.b.	0,2	1,6	8,3	1,5	7,8	9,7	1,6	25,6	0,2	124,4
15	1,9	14,7	17,0	n.b.	2,1	2,5	3,6	0,9	6,1	6,7	2,5	17,0	0,9	109,8
16	n.b.	12,1	6,7	n.b.	n.b.	1,8	1,9	2,2	5,0	4,5	2,2	12,1	1,8	90,0
17	2,2	7,2	10,1	2,7	2,4	3,6	1,2	1,5	3,9	3,1	2,6	10,1	1,5	79,5
18	1,2	10,2	20,2	4,4	2,6	3,7	0,4	3,0	5,7	6,6	3,4	20,2	1,2	115,8
19	6,2	11,6	19,1	5,7	3,6	4,1	3,0	1,3	6,8	5,8	4,9	19,1	1,3	85,3
20	3,5	n.b.	10,4	4,5	17,3	9,3	11,1	2,6	8,4	5,2	9,3	17,3	2,6	61,9
21	4,3	9,6	2,4	n.b.	2,7	2,1	0,4	2,0	3,3	3,0	2,4	9,6	0,4	90,9
22	1,3	16,4	7,5	n.b.	0,8	0,8	3,6	1,6	4,6	5,7	1,6	16,4	0,8	123,9
23	2,4	6,1	11,1	n.b.	3,0	5,0	3,3	1,5	4,6	3,2	3,3	11,1	1,5	69,6
24	n.b.	16,2	13,2	n.b.	12,4	2,1	8,1	9,2	10,2	4,9	10,8	16,2	8,1	48,0

Anhang 8: HLA-DR-negative Zellpopulation [%] von CD45⁺ /CD34⁺

K P	A	B	C	D	E	F	G	H	Mw	Sw	Med	Max	Min	VK
1	3,3	33,1	10,4	1,9	3,3	2,0	4,3	9,5	9,4	11,0	5,6	33,1	1,9	117,0
2	3,5	12,8	11,2	2,1	2,3	4,9	3,3	6,8	5,9	4,1	4,2	12,8	2,1	69,5
3	2,3	18,6	16,7	2,0	3,8	6,2	4,7	7,1	7,7	6,4	5,5	18,6	2,0	83,1
4	2,5	24,9	16,5	2,8	5,5	2,2	3,8	8,6	8,3	8,2	4,7	24,9	2,2	98,8
5	2,7	6,1	38,9	n.b.	17,2	1,1	26,6	4,6	13,9	14,3	6,1	38,9	1,1	102,9
6	3,6	15,8	5,3	n.b.	4,9	1,7	15,3	8,3	7,8	5,6	5,3	15,8	3,6	71,8
7	1,9	2,2	12,3	n.b.	3,0	5,4	2,7	5,7	4,7	3,7	3,0	12,3	1,9	78,7
8	4,3	8,0	16,1	n.b.	2,9	2,6	10,0	9,0	7,6	4,8	8,0	16,1	2,9	63,2
9	2,2	14,3	11,0	5,7	3,9	1,1	1,7	6,2	5,8	4,7	4,8	14,3	1,1	81,0
10	4,7	6,7	6,8	1,7	4,9	1,8	2,1	6,8	4,4	2,3	4,8	6,8	1,7	52,2
11	2,3	6,8	30,8	12,0	n.b.	1,7	3,2	6,0	9,0	10,2	6,0	30,8	1,7	113,3
12	5,9	3,3	20,9	4,1	10,8	5,4	11,6	9,6	9,0	5,7	7,8	20,9	4,1	63,3
13	1,6	19,4	8,9	n.b.	4,4	2,8	1,7	8,8	6,8	6,4	4,4	19,4	1,6	94,1
14	12,7	10,4	14,6	n.b.	3,6	2,0	2,1	8,8	7,7	5,2	8,8	14,6	2,1	67,5
15	3,7	7,1	12,8	n.b.	3,5	1,3	4,1	6,8	5,6	3,7	4,1	12,8	1,3	151,3
16	n.b.	15,6	5,4	n.b.	n.b.	3,2	2,7	7,3	6,8	5,2	5,4	15,6	2,7	76,5
17	8,5	8,2	12,7	1,6	5,9	1,1	3,5	10,8	6,5	4,3	7,0	12,7	1,1	66,1
18	1,9	6,7	7,6	2,4	4,0	1,8	5,6	7,4	4,7	2,5	4,8	7,6	1,8	53,2
19	3,3	10,4	12,8	1,5	6,5	2,1	2,4	5,6	5,6	4,2	4,5	12,8	1,5	75,0
20	7,6	39,5	49,5	3,5	18,8	8,7	9,1	10,2	18,4	16,9	9,6	49,5	3,5	91,8
21	3,3	7,1	4,9	n.b.	6,2	1,1	2,4	7,4	4,6	2,4	4,9	7,4	1,1	52,2
22	4,8	21,8	12,4	n.b.	36,0	1,0	10,5	7,9	13,5	11,9	10,5	36,0	1,0	88,1
23	3,9	6,3	6,3	n.b.	10,2	3,8	13,8	8,2	7,5	3,6	6,3	13,8	3,9	48,0
24	n.b.	32,1	28,2	n.b.	45,0	7,9	10,4	8,9	22,1	15,3	7,9	45,0	7,9	69,2

7 LITERATURVERZEICHNIS

Andrews RG, Torok-Storb B, Bernstein ID (1983)

Myeloid associated differentiation antigens on stem cells and their progeny identified by monoclonal antibodies.

Blood 62: 124.

Andrews RG, Takahashi M, Segal GM, Powell JS, Bernstein ID, Singer JW (1986)

The L4F3 antigen is expressed by unipotent and multipotent colony-forming cells but not by their precursors.

Blood 68:1030-1035.

Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID (1989)

Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties.

J Exp Med 169:1721-1731.

Arseniev L, Goudeva L, Kadar JG, Südmeier I, Battmer K, Matheja S, Mitschulat H, Stangel W, Link H (1995)

Flow cytometry quantification of CD34⁺ cells and other leukocyte subpopulation in frozen-thawed blood cell suspension: investigation of a new teflon container for cryopreservation of hematopoietic progenitor cells.

Infusionsther Transfusion 22:152-158.

Ashwood-Smith MJ (1961)

Preservation of mouse bone marrow at -79°C with dimethyl sulphoxide.

Nature 190:1204-1205.

Atkins, L (1962)

Preservation of viable leucocytes in glycerol at -80°C.

Nature 195:610-611.

Barnes DWH, Lóutit JF (1955)

The radiation recovery factor: preservation by the Polge-Smith-Parkes technique.

J Natl Cancer Instr 15:901-905.

Baumhueter S, Dybdal N, Kyle C, Lasky LA (1994)

Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin.

Blood 84:2554-2565.

Beelen DW, Schaefer UW (1998)

Hochdosistherapie bei hämatologischen Neoplasien.

In: Seeber S, Schütte J (eds.): Therapiekonzepte der Onkologie. Springer, Berlin: 109-139.

Bender JG, Unverzagt KL, Walker DE, Lee W, Van Epps DE, Smith DH, Stewart CC, To LB (1991)

Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry.

Blood 77:2591-2596.

Berenson RJ, Bensinger WI, Hill RS, Andrews RG, Garcia-Lopez J, Kalamasz DF, Still BS, Spitzer G, Buckner D, Bernstein ID, Thomas ED (1991)

Engraftment after infusion of CD34⁺ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma.

Blood 77:1717-1722.

Bernard A, Boumsell L (1984)

[Human leukocyte differentiation antigens] Les antigenes de differenciation leucocytaire humains.

Presse Med. 13:2311-2316.

Bezwoda WR, Seymour L, Dansey RD (1995)

High-dose chemotherapy with haematopoietic rescue as primary treatment for metastatic breast cancer: a randomized trial.

J Clin Oncol 13:2483-2489.

Bouroncle BB, Aschenbrand JF, Todd RF (1970)

Comparative study of the effectiveness of dimethyl sulfoxide and polyvinylpyrrolidone in the preservation of human leukemic blood cells at -80°C. Cryobiology 6:409-415.

Brayton CF (1986)

Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review.

Cornell Vet 76:61-90.

Campos L, Guyotat D, Larese A, Archimbaud E, Mazet L, Ehram A, Fiere D (1988)

Expression of immunological markers on leukemic cells before and after cryopreservation and thawing.

Cryobiology 25:18-22.

Civin CI, Stauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH (1984)

Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells.

J Immunol 133:157-165.

Civin CI, Banquerigo ML, Strauss LC, Loken MR (1987)

Antigenic analysis of hematopoiesis. VI. Flow cytometric characterization of My-10-positive progenitor cells in normal human bone marrow.

Exp Hematol 15:10-17.

Clark J, Pati A, McCarthy D (1991)

Successful cryopreservation of human bone marrow does not require a controlled-rate freezer.

Bone Marrow Transplant 7:121-125.

Craig W, Kay R, Cutler RL, Lansdorp PM (1993)

Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells.

J Exp Med 177: 1331-1342.

Dalchau R, Kirkley J, Fabre JW (1980)

Monoclonal antibody to a human leucocyte specific membrane glycoprotein probably homologous to the leucocyte-common antigen of the rat.

Eur J Immuno 10:737-744.

D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, Carotenuto M (1998)

Thy-1 (CDw90) and c-kit receptor (CD117) expression on CD34+ hematopoietic progenitor cells: a five dimensional flow cytometric study. Haematologica 83:587-592.

Date M, Nomura S, Katsura K, Ichiyoshi H, Kitajima H, Kishimoto Y, Kimura T, Fukuhara S (1997)

Effect of thrombopoietin on peroxidase activity of cryopreserved peripheral bleed stem cells.

Med Electron Microscopy 30:194-201.

Davis JM, Rowley SD, Braine HG, Piantadosi S, Santos GW (1990)
Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion.
Blood 75:781-786.

De Boer F, Drager AM, Van der Wall E, Pinedo HM, Schuurhuis GJ (1998)
Changes in L-Selectin expression on CD34-positive cells upon cryopreservation
of peripheral blood stem cell transplant.
Bone Marrow Transplant 22:1103-1110.

Djerassi I, Farber S, Roy A, Cavins J (1966)
Preparation and in vivo circulation of human platelets preserved with combined
dimethylsulfoxide and dextrose.
Transfusion 6:572-576.

Donaldson C, Armitage WJ, Denning-Kendall PA, Nicol AJ, Bradley BA, Hows
JM (1996)
Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood.
Bone Marrow Transplant 18:725-731.

Dörken B, Möller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G (1990)
B Cell antigen: CD38.
In: Knapp W, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, von dem Borne AEGKr (eds):
Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens. Oxford, Oxford
University Press: p 86.

Fackler MJ, Civin CI, Sutherland DR, Baker MA, May WS (1990)
Activated protein kinase C directly phosphorylates the CD34 antigen on
hematopoietic cells.
J Biol Chem 265:11056-11061.

- Farley TJ, Rooney W, Kuhns E, Ahmed T, Preti RA (1997)
An intralaboratory quality control program for quantitation of CD34+ cells by flow cytometry.
J Hematother 6:303-308.
- Faucher C, le Corroller AG, Blaise D, Novakovitch G, Manonni P, Moatti JP, Maraninchi D (1994)
Comparison of G-CSF-primed peripheral blood progenitor cells and bone marrow auto transplantation: clinical assesment and cost-effectiveness.
Bone Marrow Transplant 14:895-901.
- Feng R, Shimazaki C, Inaba T, Takahashi R, Hirai H, Kikuta T, Sumikuma T, Yamagata N, Ashihara E, Fujita N, Nakagawa M (1998)
CD34(+)/CD41a(+) cells best predict platelet recovery after autologous peripheral blood stem cell transplantation.
Bone Marrow Transplant 21:1217-1222.
- Fitzgerald M, Ahmed T, Farley T, Preti RA (1995)
Evaluation of hydroxyethyl starch (HES) for cellular cryopreservation.
J Hema-tother 4:224 (Abstract).
- Galmés A, Besalduch J, Bargay J, Matamoros N, Durán MA, Moey M, Alvarez F, Mascaró M (1996)
Cryopreservation of hemopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide at -80°C without a rate-controlled freezing.
Transfusion 36:794-797.
- Glassman AB, Christopher JB (1984)
Effect of cryopreservation on lymphocyte markers evaluated by monoclonal antibodies.
Transfusion 24:538-539.

Goldman JM (1979)

Autografting cryopreserved buffy coat cells for chronic granulocytic leukaemia in transformation.

Exp Hematol 7:389.

Goodman JW, Hodgson GS (1962)

Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice.

Blood 19:702-714.

Greipp PR, Ahmann G, Katzmann, JA (1988)

Peripheral blood as a source of stem cell in myeloma.

Blood 72:243A.

Griffin JD, Linch D, Sabbath K, Larcom P, Schlossman SF (1984)

A monoclonal antibody reactive with normal and leukemic human myeloid progenitor cells.

Leuk Res 8:521.

Gunter KC, Malek TR, Shevach EM (1984)

Cell activating properties of an anti-Thy-1 monoclonal antibody.

J Exp Med 159:716.

Haas R, Ehrhardt R, Witt B, Goldschmidt H, Hohaus S, Pforsich M, Ehrlich H, Farber L, Hunstein W (1993)

Autografting with peripheral blood stem cell mobilized by sequential interleukin-3/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor following high-dose.

Bone-Marrow-Transplant 12:643-649.

Hattori Y, Kato H, Nitta M, Takamoto S (2001)

Decrease of L-Selectin expression on human CD34+ cells on freeze-thawing and rapid recovery with short-term incubation.

Exp Hematol 29:114-122.

Hohaus S, Goldschmidt H, Ehrhardt R, Haas R (1993)

Successful autografting following myeloablative conditioning therapy with blood stem cells mobilized by chemotherapy plus rhG-CSF.

Exp Hematol 21:508-514.

Holden JT, Geller RB, Farhi DC, Holland HK, Stempora LL, Phillips CN, Bray RA (1995)

Characterization of Thy-1 (CDw90) expression in CD34⁺ acute leukemia.

Blood 86:60-65.

Holyoake TL, Alcorn MJ (1994)

CD34⁺ positive haemopoietic cells: biology and clinical applications.

Blood Rev 8:113-124.

Huang S., Terstappen LW (1992)

Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells.

Nature 360:745-749.

Inwards D, Kessinger A (1992)

Peripheral blood stem cell transplantation: historical perspective, current status, and prospects for the future.

Transfus Med Rev 6:183-190.

Jacob SW (1986)

Herschler, R.: Pharmacology of DMSO.

Cryobiology 23:14-27.

Jetter SJ (1998)

Kryokonservierung von peripheren hämatopoetischen Progenitorzellen (PBSC).
Variation der Kühlrate sowie des Verhältnisses der Kryoprotektive
Dimethylsulfoxid (DMSO) und Hydroxyethylstärke (HES).
Dissertation. Med. Fak. Universität Hamburg.

Juttner CA, To LB, Haylock DN, Branford A, Kimber RJ (1985)

Circulating autologous stem cells collected in very early remission from acute
non-lymphoblastic leukaemia produce prompt but incomplete haemopoietic
reconstitution after high dose melphalan or supralethal chemoradiotherapy.
Br J Haematol 61(4):739-745.

Kanz L, Fauser AA (1988)

Analysis of human hematopoietic progenitor cells for the expression of
glycoprotein IIIa.
Exp Hematol 16:741-747.

Kessinger A, Bierman PJ, Vose JM, Armitage JO (1991)

High-dose cyclophosphamide, carmustine, and etoposide followed by
autologous peripheral stem cell transplantation for patients with relapsed
Hodgkin's disease.
Blood 77:2322-2325.

Keung Y-K, Everardo C, Morgan D, Park M, Dixon S, Wu K, Park CH (1996)

High cellular concentration of peripheral blood progenitor cells during
cryopreservation adversely affects CFU-GM but not hematopoietic recovery.
J Hematother 5:73-77.

Knapp W, Strobl H, Majdic O (1994)

Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in leukemia
diagnosis.
Cytometry 18:187-198.

Knapp W, Strobl H, Scheinecker C, Bello-Fernandez C, Majdic O (1995)
Molecular characterization of CD34⁺ human hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol* 70:281-296.

Knorpp CT, Merchant WR, Gikas PW, Spencer HH, Thompson NW (1967)
Hydroxyethyl starch: Extracellular cryoprotective agent for erythrocytes.
Science 157:1312-1313.

Koenigsmann MP, Koenigsmann M, Notter M, Neuloh M, Mucke C, Thiel E, Berdel WE (1998)
Adhesion molecules on peripheral blood-derived CD34⁺ cells: effects of cryopreservation and short-term ex vivo incubation with serum and cytokines.
Bone Marrow Transplant 22:1077-1085.

Körber C, Scheiwe MW, Boutron P, Rau G (1982)
The influence of hydroxyethyl starch on ice formation in aqueous solutions.
Cryobiology 9(5):478-492.

Körbling M, Dörken B, Ho AD, Pezzutto A, Hunstein W, Flidner TM (1986)
Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's Lymphoma.
Blood 67:529-532.

Kroczek RA, Gunter KC, Germain RN, Shevach EM (1986a)
Thy-1 function as a signal transduction molecule in T lymphocytes and transfected B lymphocytes.
Nature 322:181-184.

Kroczek RA, Gunter KC, Seligmann B, Shevach EM (1986b)
Induction of T cell activation by monoclonal anti-Thy-1 antibodies.
J Immunol 136:4379-4384.

Lai R, Visser L, Poppema S (1991)

Tissue distribution of restricted leukocyte common antigens. A comprehensive study with protein- and carbohydrate-specific CD45R antibodies.

Lab Invest 64:844-854.

Lansdorp PM, Sutherland HJ, Eaves CJ (1990)

Selective expression of CD45 isoforms on functional subpopulations of CD34+ hemopoietic cells from human bone marrow.

J Exp Med 172:363-366.

Lansdorp PM (1995)

CD_w90 cluster workshop report.

In: Leucocyte Typing V, Schlossma, S.F., et al. Eds, Oxford University Press: 967-968.

Laxenaire MC, Charpentier C, Feldmann L (1994)

Réactions anaphylactoides aux substituts colloïdaux du plasma: incidence, facteurs de risque, mécanismes.

Ann Fr Anesth Réanim 13:301-310.

Lee JH, Hillyer CD (1995)

Circulating hematopoietic progenitor and mononuclear cells: Clinical indications, advancements and future applications.

In: Brecher ME, Lasky LC, Sacher RA, Issit LA (eds): Hematopoietic Progenitor Cells: Processing, Standards and Practice. American Association of Blood Banks, Bethesda, pp 125-158.

Leibo SP, Farrant J, Mazur P, Hanna MG, Smith LH (1970)

Effects of freezing on marrow stem cell suspension: interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose, or glycerol.

Cryobiology 6:315-332.

Leibo SP, Mazur P (1971)

The role of cooling rates in low-temperature preservation.
Cryobiology 8:447-452.

Link H (1995)

G-CSF und GM-CSF: Wachstumsfaktoren der Hämatopoese.
In: Schölmerich P, Mutschler E, Thews G: Arzneimitteltherapie 7:198-206.

Liu CM, Muirhead KA, George SP, Landay AL (1989)

Flow cytometric monitoring of human immunodeficiency virus-infected patients.
Simultaneous enumeration of five lymphocyte subsets.
Am J Clin Pathol 92:721-728.

Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI (1987)

Flow cytometric analysis of human bone marrow: Normal erythroid development.
Blood 69:255-263.

Loken MR, Brosnan JM, Bach BA, Ault KA (1990)

Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry.
Cytometry 11:453-459.

Lovelock JE, Bishop MWH (1959)

Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide.
Nature 183:1394-1395.

Lu L, Walker D, Broxmeyer HE, Hoffman R, Hu W, Walker E (1987)

Characterization of adult human marrow hematopoietic progenitors highly enriched by two-color cell sorting with My10 and major histocompatibility class II monoclonal antibodies.
J Immunol 139:1823-1829.

Lundberg A, Yankee RA, Henderson ES, Pert JH (1967)

Clinical effectiveness of blood platelets reserved by freezing.

Transfusion 7:380-381.

Majdic O, Stöckl J, Pickl WF, Bohuslav J, Strobl H, Scheinecker C, Stockinger H, Knapp W (1994)

Signaling and induction of enhanced cytoadhesiveness via the hematopoietic progenitor cell surface molecule CD34.

Blood 83:1226-1234.

Makino S, Harada M, Akashi K, Taniguchi S, Shibuya T, Inaba S, Niho Y (1991)

A simplified method for cryopreservation of peripheral blood stem cells at -80 degrees C without rate-controlled freezing.

Bone Marrow Transplant 8:239-244.

Mazur P, Leibo SP, Chu EHY (1972)

A two-factor hypothesis of freezing injury.

Exp Cell Res 71:345-355.

Mishler J (1982)

Pharmacology of Hydroxyethyl Starch.

Oxford University Press, New York.

Molgaard HV, Spurr NK, Greaves MF (1989)

The hemopoietic stem cell antigen CD34+ is encoded by a gene located on chromosome 1.

Leukemia 3:773-776.

Mollison PL, Sloviter HA (1951)

Successful transfusion of previously frozen human red cells.

Lancet 261:862-864.

Mueller-Eckhardt W, Stangel L (1996)

Gewinnung, Konservierung, Lagerung von Transfusionsblut.

In: Mueller-Eckhardt W: Transfusionsmedizin. Springer-Verlag, Berlin, p 237-242.

Mullaney PF, Van Dilla MA, Coulter JR, Dean PN (1969)

Cell sizing: a light scattering photometer for rapid volume determination.

Rev Sci Instrum 40:1029-1032.

Murray L, DiGiusto D, Chen B, Chen S, Combs J, Conti A, Galy A, Negrin R, Tricot G, Tsukamoto A (1994)

Analysis of human hematopoietic stem cell populations.

Blood Cells 20:364-369.

Murray L, Chen B, Galy A, Chen S, Tushinski R, Uchida N, Negrin R, Tricot G, Jagannath S, Vesole D (1995)

Enrichment of human hematopoietic stem cell activity in the CD34+Thy-1+Lin- subpopulation from mobilized peripheral blood.

Blood 85:368-378.

Murray LJ, Mandich D, Bruno E, DiGusto RK, Fu WC, Sutherland DR, Hoffman R, Tsukamoto A (1996a)

Fetal bone marrow CD34+CD41+ cells are enriched for multipotent hematopoietic progenitors, but not for pluripotent stem cells.

Exp Hematol 24:236-245.

Murray LJ, Tsukamoto A, Hoffman R (1996b)

CD34+Thy-1+Lin- stem cells from mobilized peripheral blood.

Leuk Lymphoma 22:37-42.

Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH (1990)
Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 143:3183.

Nathan DG (1990)
Regulation of hematopoiesis.
Pediatr Res 27:423-431.

Nothdurft W, Bruch C, Fliedner TM (1977)
Studies on regeneration of the CFU-C population in blood and bone marrow of lethally irradiated dogs after autologous transfusion of cryopreserved mononuclear blood cells.
Scand J Haematol 19:470-481.

Peiper SC, Ashmun RA, Look AT (1988)
Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of a human gene encoding the CC33 myeloid differentiation antigen.
Blood 72:314-321.

Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA (1988)
The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex.
Blood 71:831-843.

Platzer E (1989)
Human haematopoietic growth factors.
Eur J Haematology 42:1-15.

Polge C, Smith AU, Parkes AS (1949)
Revival of Spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures.
Nature 164:666.

Raffael A, Nebe CT, Valet G (1988)

Grundlagen der Durchflußzytometrie.

In: Schmitz G, Rothe G Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York.

Recktenwald DJ (1993)

Introduction to flow cytometry: principles, fluorochromes, instrument set-up, calibration.

J Hematother 2:387-394.

Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Levey RH, Schlossman SF (1980)

Discrete stages of human intrathymic differentiation: Analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage.

Proc Natl Acad Sci USA 77:1588-1592.

Richer EA (2000)

Wissenschaftsbetrug: Der Fall Bezwoda.

Dt. Ärztebl 97: A-752.

Richter W, Hedin H (1983)

Solutions and emulsions used for intravenous infusion.

In: De Wack AL, Bundgaard H (eds): Allergic Reactions To Drugs. Handbook Of Experimental Pharmacology. Springer Berlin, p 582.

Robertson MJ, Soiffer RJ, Freedman AS, Rabino SL, Anderson KC, Ervin TJ, Murray C, Dear K, Griffin JD, Nadler LM, Ritz J (1992)

Human bone marrow depleted of CD33-positive cells mediates delayed but durable reconstitution of hematopoiesis: Clinical trial of MY9 monoclonal antibody-purged autografts for the treatment of acute myeloid leukemia.

Blood 79:2229-2236.

Rosillo MC, Ortuno F, Rivera J, Moraleda JM, Vicente V (1995)
Cryopreservation modifies flow-cytometric analysis of hemopoietic cells.
Vox Sang 68(4):210-214.

Rowley SD (1992)
Hematopoietic stem cell cryopreservation: a review of current techniques.
J Hematother 1(3):233-250.

Rowley SD, Bensinger WI, Gooley TA, Buckner CD (1994)
Effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell
cryopreservation.
Blood 83:2731-2736.

Rowley SD (1996)
Cryopreservation of blood stem cells in dimethylsulfoxide (DMSO) with or
without hydroxyethylstarch (HES).
Abstracts 24th Congress of the ISTB, Makuhari Messe (Japan), p. 15.

Sachs L (1992)
Angewandte Statistik.
Springer, Berlin: 489-494.

Salzman GC, Crowell JM, Martin JC, Trujillo TT, Romero A, Mullaney PF,
LaBauve PM (1975)
Cell classification by laser light scattering: identification and separation of
unstained leukocytes.
Acta Cytol 19:374-377.

Schaefer UW, Beyer JH (1975)
Die protektive Wirkung von Hydroxyäthylstärke bei der Kryokonservierung von
Knochenmark der Maus und des Menschen.
Anaesthesist 24:505-506.

Schlossman S, Boumsell S, Gilks W (1995)

Leukozyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens.

New York: Oxford University Press, p 840.

Serke S, Zingsem J, Zimmermann R (1993)

Optimierung der Leukozytapheresen zur Gewinnung zirkulierender hämopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen durch Multiparameter-Durchflußzytometrie.

Beitr Infusionsther 31:124-129.

Serke S, Huhn D (1996)

Expression of class I, II and III epitopes of the CD34 antigen by normal and leukemic hematopoietic cells.

Cytometry 26:154-160.

Sharp JG, Kessinger MA, Pirruccello SJ (1991)

Frequency of detection of suspected lymphoma cells in peripheral blood stem cell collections. In Dicke KA, Armitage JO, Dicke-Evinger MJ (eds): Autologous Bone Marrow Transplantation, Proceedings of the Fifth International Symposium.

Omaha, NE, The University of Nebraska Medical Center.

Sieff C, Bicknell D, Caine G, Robinson J, Lam G, Greaves M.F (1982)

Changes in cell surface antigen expression during hemopoietic differentiation.

Blood 60:703-713.

Sieff CA, Tsai S, Faller DV (1987)

Interleukin 1 induces cultured human endothelial cell production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

J Clin Invest 79:48-51.

Siena S, Bregni M, Brando B, Ravagnani F, Bonadonna G, Gianni AM (1989)
Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.
Blood 74:1905-1914.

Siena S, Bregni M, Brando B (1991)
Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients.
Blood 77:400-409.

Siena S, Bregni M, Brando B, Belli N, Lansdorp PM, Bonadonna G, Gianni M (1991)
Flow cytometry to estimate circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation: comparative analysis of different CD34 monoclonal antibodies.
Haematol 76:330-333.

Sloviter HA (1951)
Recovery of human red blood cells after freezing.
Lancet 261:823-824.

Smith AU (1950)
Prevention of haemolysis during freezing and thawing of red blood-cells.
Lancet II, 259:910-911.

Smith DM, Weisenburger DD, Bierman P, Kessinger A, Vaughan WP, Armitage JO (1987)
Acute renal failure associated with autologous bone marrow transplantation.
Bone Marrow Transplantat 2:195-201.

Sputtek A, Gutensohn K, Hummel K, Löliger C, Kühnl P (1996)
Zur Kryokonservierung von Blutstammzellen
J Lab Med 20: 70-77.

Steinkamp JA, Romero A, Van Dilla MA (1973)
Multiparameter cell sorting: identification of human leukocytes by acridine orange fluorescence.
Acta Cytol 17:113-117.

Stiff PJ, Murgu AJ, Zaroulis CG, DeRisi MF, Clarkson BD (1983)
Unfractionated human marrow cell cryopreservation using dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch.
Cryobiology 20:17-24.

Stiff PJ, Koester AR, Weidner MK, Dvorak K, Fisher RI (1987)
Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing.
Blood 70(4):974-978.

Streuli M, Morimoto C, Schrieber M, Schlossman SF, Saito H (1988)
Characterization of CD45 and CD45R monoclonal antibodies using transfected mouse cell lines that express individual human leukocyte common antigens.
J Immunol 141:3910-3914.

Sunderland CA, McMaster WR, Williams AF (1979)
Purification with monoclonal antibody of a predominant leukocyte-common antigen and glycoprotein from rat thymocytes.
Eur J Immunol 9:155-159.

Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM (1989)
Characterization and partial purification of human marrow cells capable of
initiating long-term hematopoiesis in vitro.

Blood 74:1563-1570.

Sutherland DR, Marsh JCW, Davidson J, Baker MA, Keating A, Mellors A
(1992a)

Differential sensitivity of CD34 epitopes to cleavage by *Pasteurella haemolytica*
glycoprotease: Implications for purification of CD34-positive progenitor cells.
Exp Hematol 20:590-592.

Sutherland DR, Keating A (1992b)

The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications.
J Hematother 1:115-129.

Sutherland DR, Stewart AK, Keating A (1993)

CD34 antigen: molecular features and potential clinical applications.
Stem Cell 11 Suppl 3:50-57.

Takahashi T, Hirsh A, Erbe E, Williams RJ (1988)

Mechanism of cryoprotection by extracellular polymeric solutes.
Biophys J 54:509-518.

Tedder TF, Clement LT, Cooper MD (1984)

Discontinuous expression of a membrane antigen (HB-7) during B lymphocyte
differentiation.

Tissue Antigens 24:140-149.

Terhorst C, Van Aghtoven A, Le Clair K, Snow P, Reinherz E, Schlossman S (1981)

Biochemical studies of the human thymocyte on cell-surface antigens T6, T9 and T10.

Cell 23:771-780.

Terstappen LW, Loken MR (1988)

Five-dimensional flow cytometry as a new approach for blood and bone marrow differentials.

Cytometry 9:548-556.

Terstappen LW, Johnson S, Segers-Nolten IMJ, Loken M (1990)

Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. B

lood 76:1739-1747.

Terstappen LW, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR (1991)

Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells.

Blood 77(6):1218-1227.

Terstappen LW, Safford M, Unterhalt M, Konemann S, Zurlutter K, Piechotka K, Drescher M, Aul C, Buchner T, Hiddemann W (1992)

Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia: IV. Comparison to the differentiation pathway of normal hematopoietic progenitor cells.

Leukemia 6:993-1000.

Terstappen LW, Huang S (1994)

Analysis of bone marrow stem cells.

Blood cells 20:45-63.

Thomas ML (1989)

The leukocyte common antigen family.

Annu Rev Immunol 7:339-369.

Tjonnfjord GE, Steen R, Evensen SA, Thorsby E, Egeland T (1994)

Characterization of CD34+ peripheral blood cells from healthy adults mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor.

Blood 84:2795-2801.

Tong J, Hoffman R, Siena S, Srour EF, Bregni M, Gianni AM (1994)

Characterization and quantitation of primitive hematopoietic progenitor cells present in peripheral blood autografts.

Exp.Hematol. 22:1016-1024.

Tonks NK, Charbonneau H, Diltz CD, Fischer EH, Walsh KA (1988)

Demonstration that the leukocyte common antigen CD45 is a protein tyrosin phosphatase.

Biochemistry 27:8698.

Willhite CC, Katz PI (1984)

Dimethyl sulfoxide.

J Appl Toxicol 4:155-160.

Williams DE, Boswell HS, Floyd AD, Broxmeyer HE (1985)

Pluripotential hematopoietic stem cells in post-5-fluorouracil murine bone marrow express the Thy-1 antigen.

J Immunol 135:1004.

Woollett GR, Barclay AN, Puklavec M, Williams AF (1985)

Molecular and antigenic heterogeneity of the rat leukocyte-common antigen from thymocytes and T and B lymphocytes.

Eur J Immunol 15:168-173.

Zander AR, Zeller W, Stockschläger M, Berger C, Krüger W, Grimm J, Hummel K, Löliger C, Kühnl P, Kabisch H (1996)

Mobilization of progenitor cells for autologous and allogenic transplantation.

In Zander AR, Ostertag W, Afanasiev BV, Grosfeld F (eds). Gene Technology, NATO ASI Series, Vol. H 94, Springer, Berlin.

8 DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Dr. med. P. Kühnl, Direktor der Abteilung für Transfusionsmedizin und Transplantationsimmunologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, möchte ich mich für die Überlassung des Themas und Übernahme des Referats herzlich bedanken.

Besonderer Dank gebührt Herrn Dr. med. A. Sputtek für die kontinuierliche und verlässliche wissenschaftliche Unterstützung für den Teil der Kryokonservierung sowie die Motivation und die geduldige Hilfe während der Arbeit.

Weiterhin möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. K. Gutensohn für die gute Betreuung bei durchflußzytometrischen Analysen danken.

Zu danken ist weiterhin den MTLA`s Frau J. Preuß, Frau Reckhaus und Frau Merle, deren gute Zusammenarbeit bei dieser Arbeit sich durch kompetente Anleitung und Engagement auszeichnete.

Mein Dank gilt besonders meinen Eltern, die mir das Studium und die Durchführung der Dissertation erst ermöglichten, und meinen Freunden, die viel Verständnis zeigten und mich auf persönliche Art geduldig unterstützten.

9 LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Corinna Feldmann
Geburtstag, -ort: 08.10.1970, Neumünster (Schleswig-Holstein)

Schulbildung

1977 - 1981: Grundschule Henstedt-Ulzburg
1981 - 1990: Gymnasium Henstedt-Ulzburg, Abitur 1990

Berufsausbildung

1990 - 1992: Ausbildung zur medizinisch-technischen Assistentin (MTA) im Forschungsinstitut Borstel

Beruflicher Werdegang

10.1992 - 03.1993: MTA im Institut für Med. Mikrobi- und Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Hochschulausbildung

04.1993: Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg
03.1995: Ärztliche Vorprüfung
03.1996: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
09.1998: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
12.1999: Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Arzt im Praktikum

04.2000 - 09.2001 Allgemeines Krankenhaus Eilbek, Hamburg

Assistenzärztin

ab 10.2001 Klinikum Elmshorn

10 ERKLÄRUNG

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, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.