UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Diagnostik

Institut für Transfusionsmedizin

Direktor der Einrichtung
Dr. med. Sven Peine

Immunzytometrische, volumetrische *Single-Platform*-Analytik von CD34+ Stammzellen und Progenitorzellen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Alexander Nikolitsis

aus Hamburg

Hamburg 2014

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 30.07.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:	PD Dr. Kai Gutensohn
Prüfungsausschuss, 2. Gutachter:	PD Dr. Andreas Humpe
Prüfungsausschuss, 3. Gutachter:	Prof. Dr. Thomas Renné

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 2

1. Einleitung 4

1.1 Ziele der Studie 5
1.2 Stammzellen 5
1.2.1 Periphere Blutstammzellen 6
1.2.2 Medizinische Indikationen peripherer Blutstammzelltransplante 6
1.2.3 Monitoring und Apheresate 7
1.2.4 Knochenmarksstammzellen 8
1.2.5 Nabelschnurblutstammzellen 8
1.2.6 Kryokonservierung 8
1.3 Durchflusszytometrie 10
1.3.1 Historische Entwicklung der Durchflusszytometrie 10
1.3.2 Prinzip der Durchflusszytometrie 11
1.3.3 CD34-Antigen 13
1.3.4 CD45-Antigen 13
1.3.5 Antikörper, Epitope und Fluorochrome 13
1.3.6 Stem-Kit 14
1.3.7 Gating-Strategie und Auswertung der Durchflusszytometrie 15
1.3.8 Dual- und Single-Platform-Methode sowie ISHAGE-Protokoll 16
1.3.9 Colony Forming Units 18

2. Material und Methoden 19

2.1 Patientenkollektiv und Blutproben 19
2.2 Probenvorbereitung: Apheresate, peripheres venöses Blut 20
2.3 Kryokonservierte Proben 21
2.4 Die verwendeten Durchflusszytometer 23
2.5 Statistische Analyse 23

3. Ergebnisse 24

3.1 Analysen der peripheren Blutstammzellproben 24
3.2 Analysen der Apheresatproben 26
3.3 Analysen nach Kryokonservierung aus aufgetauten Proben 29
3.4 Kosten 31
3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse 32

4. Diskussion 33

5. Zusammenfassung 38

6. Abkürzungsverzeichnis 39

7. Literaturverzeichnis 41

8. Danksagung 48

9. Lebenslauf 49

10. Eidesstattliche Erklärung 50

1. Einleitung

Die Stamm- und Progenitorzellen des hämatopoetischen Systems (HPC = *hematopoietic progenitor cells*) besitzen das muzinähnliche Oberflächenprotein CD34 (*Cluster of Differentiation 34*), welches mit Hilfe der Immunzytometrie gemessen werden kann (Sutherland et al., 2009).

CD34+ Stammzellen kommen im peripheren Blut in sehr geringer Menge vor (Wissenschaftlicher Beirat der BÄK, 1997), das heißt, mit etwa 0,05 % der Leukozyten oder anders ausgedrückt, weniger als 5 CD34+ Stammzellen pro Mikroliter Blut (Brando et al., 2000). Sie können aber durch Chemotherapie und/oder Wachstumsfaktoren aus dem Knochenmark ausgeschwemmt werden (Wissenschaftlicher Beirat der BÄK, 1997) und von 0,05% zu einem Anteil von 6-8% der Leukozyten im peripheren Blut steigen (Brando et al., 2000). Dort können sie für ein Transplantat mittels Zytapherese gesammelt und bis zu ihrem therapeutischen Einsatz in gefrorenem Zustand gelagert werden (Barnett et al., 2000). Die CD34+ Zellen werden, nach einer myeloablativen Therapie für die Wiederherstellung des hämatopoetischen Systems benötigt (Keeney et al., 2004a). Die Zahl dieser klinischen Anwendungen ist sowohl für autologe als auch für allogene Stammzelltransplantationen in den vergangenen Jahren kontinuierlich gestiegen (Copelan, 2006), so beispielsweise im Rahmen der dosisreduzierten Konditionierung von älteren Patienten, der Behandlung von soliden Tumoren, seltenen Lymphomsubgruppen und myeloproliferativen Syndromen sowie Autoimmunerkrankungen und Amyloidose (Ljungman et al., 2010; Ljungman et al., 2006).

Für die autologe und allogene Stammzelltransplantation ist die Abschätzung des Engraftmentpotentials eines Stammzellprodukts von zentraler Bedeutung (Sutherland et al., 2009). Das Engraftment bezeichnet dabei den Zeitpunkt nach einer Transplantation, an dem es dem Transplantat möglich ist, eine für das Leben ausreichende Menge an hämatopoetischen Zellen zu bilden. So führen periphere Stammzelltransplantate zur Rekonstitution des Knochenmarks (Devetten et al., 2007). Die Eignung der Transplantate wird heute meist anhand der Anzahl von CD34+ Zellen/kg Körpergewicht (KG) festgelegt (Sutherland et al., 2009), dessen Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie erfolgt. Für die Abschätzung des klinischen Verlaufs ist die genaue Bestimmung der CD34+ Stammzellen unabdingbar (Gratama et al., 2001; Watts, 1999).

Des Weiteren kann mit Hilfe des Durchflusszytometers das so genannte Monitoring am Patienten durchgeführt werden, um die Anzahl von im peripheren Blut mobilisierten

CD34+ Zellen zu bestimmen und damit den optimalen Zeitpunkt für die Leukapherese festzulegen, ferner um die Zahl der Leukapheresen, Zeit und Kosten abschätzen zu können (Brando et al., 2000; Sutherland et al., 2009).

1.1 Ziele der Studie

Es hat sich gezeigt, dass die immunzytometrische Single-Platform-Methode zur Messung von CD34+ Zellen der Dual-Platform-Methode überlegen ist. Aus diesem Grund werden in dieser Studie zwei, auf Single-Platform-Verfahren basierte, Durchflusszytometer miteinander verglichen.

Zum einen handelt es sich um das Durchflusszytometer Epics XL (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland). Dieses arbeitet Bead-basiert und erlaubt eine indirekte Messung der absoluten CD34+ Zellzahl.

Zum anderen handelt es sich um das Durchflusszytometer C6 der Firma Accuri (Accuri Cytometers, Ann Arbor, MI, USA [2011 aufgekauft durch Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA]). Dieses erlaubt volumetrische Messungen, was ein direktes Ergebnis der absoluten CD34+ Zellzahl zur Folge hat. Dies wiederum kann zu schnelleren und kostengünstigeren Ergebnissen führen.

Aus diesem Grund werden in dieser Studie als weitere Ziele sowohl die qualitativen Leistungen beider Geräte erfasst, als auch der ökonomische Aspekt berücksichtigt.

1.2 Stammzellen

Stammzelltransplantationen werden seit den späten 50er Jahren erfolgreich für die Rekonstruktion des hämatopoetischen Systems nach myeloablativen Therapien eingesetzt (Thomas et al., 1957). Die Messung der Anzahl hämatopoetischer Stammzellen ist entscheidend, um eine Aussage über das Engraftment und somit die Länge der Wiederherstellung des hämatopoetischen Systems zu treffen (Lamb, 2002). Heutzutage sind Stammzelltransplantationen ein unverzichtbarer Bestandteil in der Behandlung von hämatologischen, onkologischen und schweren immunologischen Erkrankungen. Für den klinischen Verlauf ist eine präzise Zählung von CD34+ hämatopoetischen Stammzellen vor der Stammzelltransplantation zwingend nötig (Watts, 1999; Gratama et al., 2001). Die CD34+ Stammzellen hierfür kommen in folgenden drei Kompartimenten vor und lassen sich aus diesen folgendermaßen gewinnen:

1.2.1 Periphere Blutstammzellen

Im peripheren Blut eines gesunden Menschen befinden sich 0,01 - 0,1% CD34+ Zellen (D´Arena et al. 1996; To et al. 1997). Vor etwa drei Jahrzehnten zeigten Patienten mit Tumorleiden nach einer zytoreduktiven Therapie einen Anstieg an HPC. Dieser Zellzahlanstieg, auch Mobilisierung genannt, konnte durch rekombinante hämatopoetische Wachstumsfaktoren wie G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) weiter erhöht werden. Des Weiteren führen auch Radiotherapien und Sport zu einer Mobilisierung der Stammzellen (Siena et al., 1989; Gianni et al., 1989; Gratama et al., 2001; Fritsch, 2012). Die hämatopoetischen Stammzellen werden daher seit vielen Jahren hauptsächlich aus dem peripheren Blut gewonnen (Levering et al., 2007).

Der Erfolg einer Transplantation mit Blutstammzelltransplantaten, Knochenmark oder Nabelschnurblutstammzellen ist nicht nur abhängig von phänotypischen Kompatibilitäten, sondern auch von der Anzahl der CD34+ Zellen/kg KG im Transplantat oder der Körperoberfläche des Empfängers (Ngoma et al., 2011).

1.2.2 Medizinische Indikationen peripherer Blutstammzelltransplante

Viele klinische Studien haben bestätigt, dass Transplantationen mit CD34+ Zellen sicher sind und einen langfristigen Effekt haben (Keeney et al., 2004b). Es existieren drei wesentliche medizinische Anwendungsbereiche von peripheren Blutstammzelltransplantaten.

Bei der ersten Anwendung werden dem Patienten präventiv autologe Stammzellen retransfundiert, sodass eine über die Norm dosierte zytostatische Chemotherapie (und/oder Bestrahlung) ermöglicht wird, da die Toleranz des Knochenmarks gesteigert wurde.

Der zweite Anwendungsbereich bezieht sich auf die myeloablative Therapie, wobei Zytostatika und/oder Bestrahlung in einer Hochdosistherapie eingesetzt werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine irreversible Zerstörung der Hämatopoese zur Folge haben. Nachfolgend ist eine Stammzelltransplantation dringend erforderlich.

Ein anderer Anwendungsbereich ist die allogene Stammzelltransplantation, wobei einem HLA-identischen (Human Leukocyte Antigen) Spender periphere Blutstammzellen entnommen werden und diese nach ausreichender Konditionierung dem Empfänger transplantiert werden (Wissenschaftlicher Beirat der BÄK, 1997).

1.2.3 Monitoring und Apheresate

Um für eine Transplantation adäquate Leukapherese produkte zu erhalten, ist die Zahl der im peripheren Blut mobilisierten CD34+ Zellen von entscheidender Bedeutung (Gratama et al., 2001). Die Mobilisierung kann unter anderem durch Chemotherapie, G-CSF oder Granulozyten-Makrophagen-CSF erfolgen (Humpe et al., 2005). Um möglichst ergiebige Apheresate zu erhalten, spielt das tägliche Monitoring des peripheren Blutes des Patienten vor der Apherese eine bedeutende Rolle (Gratama et al., 2001). Wenn die abgenommene Blutprobe weniger als 10 CD34+ Zellen/µL enthält, wird von einem unzureichenden Apheresat von weniger als 0,5 x 10^6 CD34+ Zellen/kg KG ausgegangen (Gratama et al., 2001). Neuere Studien haben gezeigt, dass 5 CD34+ Zellen/µL eine Vorhersage eines Apheresats von mindestens 0,5 x 10^6 Zellen/kg KG erlauben (Sutherland et al., 2009). Werden im peripheren Blut 10–20 CD34+ Zellen/µL gemessen, führt diese Zellzahl im Allgemeinen zu einem Apheresat von 0,5–1 x 10^6/kg KG. Ein Messergebnis im peripheren Blut von 20–40 CD34+ Zellen/kg erzeugt etwa 1–2 x 10^6 CD34+ Zellen/kg KG. Ein Monitoring mit mehr als 40 CD34+ Zellen/µL spricht für eine sehr gute Mobilisierung, die in den meisten Fällen ein Transplantat von 2 x 10^6/kg sichert (Gratama et al., 2001; Keeney et al., 1998).

Für die Berechnung des Apheresats bei allogenen Blut- und Knochenmarkstransplantationen in der klinischen Praxis wird empfohlen, Bezug auf das ideale Körpergewicht zu nehmen und nicht auf das aktuelle Körpergewicht (Cilley et al., 2004).

Wird einem Patienten ein Apheresat von 2,5 x 10^6 Zellen/kg KG (vor der Kryokonservierung gemessen) verabreicht, erfolgt voraussichtlich ein Engraftment des hämatopoetischen Systems 12 bis 14 Tage nach der Infusion (Sutherland et al., 2009). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass sich das Engraftment bei Patienten, die weniger als 2 x 10^6 CD34+ Zellen/kg KG erhalten haben, deutlich langsamer entwickelte (Mittelwert 17 Tage) als bei Patienten, die mehr als 2 x 10^6 CD34+ Zellen/kg KG (Mittelwert 12 Tage) beziehungsweise mehr als 5 x 10^6 CD34+ Zellen/kg KG (Mittelwert 10 Tage) erhalten haben (Sutherland et al., 2003).

Die PBSC-Transplantation (peripheral blood stem cells transplantation) führt im Gegensatz zur Knochenmarkstransplantation zu einer schnelleren Wiederherstellung des hämatopoetischen Systems. Dadurch entstehen neben einem geringeren Kontaminationsrisiko durch Tumorzellen auch geringere Krankenhauskosten und eine erhöhte Anzahl an T-Lymphozyten und Natural-Killer-Zellen (NK cells), was einem Post-Transplantat-Rückfall und dem Gebrauch an Medikamenten entgegensteht (Barnett et

al., 1999). Die reduzierten Krankenhauskosten kommen unter anderem dadurch zu Stande, dass die Entnahme peripherer Blutstammzellen hingegen der Gewinnung der Knochenmarksstammzellen keiner Narkose bedarf (Wissenschaftlicher Beirat der BÄK, 1997). Darüber hinaus kann das PBSC-Produkt ex vivo besser bearbeitet werden, wie beispielsweise die Selektion von CD34+ Zellen, die Elimination von Tumorzellen und der Gen-Transfer (Barnett et al., 1999).

1.2.4 Knochenmarksstammzellen

Im Knochenmark befinden sich physiologischerweise ungefähr 1% CD34+ Zellen. Die Gewinnung der Knochenmarksstammzellen wird in Vollnarkose durchgeführt, da das Knochenmark aus dem Beckenkamm entnommen wird (Goldman, 1994), wobei es zu Nebenwirkungen kommen kann. Wichtig bei der allogenen Knochmarkstransplantation (KMT) ist es, einen passenden Spender, der die gleichen HLA-Oberflächenproteine trägt, zu finden. Dies trifft nur in etwa 25% der Fälle zu. Wird ein HLA-Typ transplantiert der nicht mit dem Empfänger übereinstimmt, steigt die Wahrscheinlichkeit für eine Abstoßungsreaktion oder einer Graft-versus-Host-Krankheit stark an (Theilgaard-Mönch et al., 1999). Die Knochenmarkstransplantationen werden seit Ende der Fünfzigerjahre erfolgreich durchgeführt (Gratama et al., 2001).

1.2.5 Nabelschnurblutstammzellen

Nabelschnurblut hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Es ist zu einer wichtigen Quelle von HPC geworden und weltweit wurden Blutbanken eingerichtet, in denen Nabelschnurblut mittels Kryokonservierung gelagert wird (Gratama et al., 2001; Sutherland et al., 2009; Hunt et al., 2003). Die weltweit erste Nabelschnurbluttransplantation fand 1988 statt (Gluckman et al., 1989).

Zur Gewinnung der Nabelschnurblutstammzellen wird die Nabelschnur postpartal punktiert und das Plazentarestblut in einem Sammelbeutel aufgefangen. In der Blutbank wird die Probe für die Konservierung zentrifugiert und anschließend mittels Zugabe einer Konservierungslösung zur Lagerung tiefgefroren (ZKRD, 2011).

1.2.6 Kryokonservierung

Die Anfänge der Kryokonservierung lassen sich auf das Jahr 1948 zurückführen, als Polge et al. das Glycerin als Kryoprotektiv entdeckten. Smith beschrieb 1950 für Erythrozyten den Schutz vor Hämolyse während der Einfrier– und Auftauprozesse durch

Glycerin. 1951 entwickelte Solviter ein Dialyseverfahren zur Glycerinauswaschung und führte zusammen mit Mollison die erste Transfusion mit aufgetauten Erythrozyten durch. Barnes und Loutit gelang in einem Tierexperiment 1955 die erste erfolgreiche Transfusion von zuvor kryokonservierten homologen Knochenmarksstammzellen. Körbling et al. beschrieben 1986 die erste erfolgreiche Behandlung mit autologen hämatopoetischen Stammzellen, die im Rahmen der Vorbehandlung mittels Leukapherese gewonnen, kryokonserviert und anschließend wieder aufgetaut worden waren (Körbling et al., 1986).

Solange die Glasübergangstemperatur für reines Wasser unterschritten wird, spielt die Lagerungstemperatur nur eine untergeordnete Rolle. Lovelock stellte 1953 anhand zweier verschiedener Experimente fest, dass wahrscheinlich nicht die „Eiskristallbildung selbst, sondern eher der damit verbundene ‚Anstieg der Elektrolytkonzentration im Extrazellulärraum' die Zellen schädigt." (Lovelock, 1953).

Der mittlere Prozentsatz für die Erholung lebensfähiger CD34+ Zellen nach der Kryokonservierung lag in einer Studie mit 52 Patienten bei 66.4% (Yang et al., 2005). Bei vier der Patienten lag die Erholung der CD34+ Zellen bei unter 50%. Dies führte jedoch zu keinem Unterschied des Engraftments im Vergleich zu den anderen Patienten (Yang et al., 2005).

Es hat sich gezeigt, dass sich Stammzellen aus Nabelschnurblut, die kryokonserviert und für 5, 10 und 15 Jahren in flüssigen Stickstoff gelagert wurden, keinen signifikanten Unterschied in Zellproliferation und –lebensfähigkeit zeigten. Das weist darauf hin, dass es während des Einfrierens und des Auftauens zum Zellverlust kommt und nicht während der Lagerung (Yang et al., 2005). Eine Studie ergab, dass für eine optimale Wiederherstellung der CD34+ Zellen eine aufeinander folgende Zugabe von Dimethylsulfat (Me_2SO_4), eine langsame Kühlung zwischen 1°C und 2,5°C/min und eine serielle Auswaschung des Kryoprotektivums erforderlich ist (Hunt et al., 2003). Eine andere Studie zeigte, dass eine Lagerung über Nacht vor der Kryokonservierung keinen nennenswerten Effekt auf die Viabilität zeigt. Des Weiteren wurde kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Verträglichkeit durch die Beanspruchung des Einfrierens und Auftauens zwischen den Zellen schwer vorbehandelter Patienten und gesunden allogenen Spendern entdeckt (Fietz, et al., 2002). Letztendlich wurde bei den meisten Proben kein Unterschied der CD34–Population aufgedeckt (Fietz et al., 2002).

Zunehmend wichtig wird die CD34+ Zellanalyse der postkryokonservierten Proben. Denn es hat sich gezeigt, dass die Zahl der lebensfähigen Stamm– und Vorläuferzellen

des endgültigen Transplantats vor der Transfusion die hämatopoetische Rekonstitution und den klinischen Erfolg beeinflussen (Allen et al., 2002; Yang et al., 2005).

1.3 Durchflusszytometrie

1.3.1 Historische Entwicklung der Durchflusszytometrie

Die Ära der Durchflusszytometrie begann 1953 als Wallace Henry Coulter ein Gerät konstruierte, um Zellen in Kochsalzlösung einzeln zu zählen und ihre Größe zu bestimmen (whcf.org, 2013). Dieses Gerät ließ sich Wallace H. Coulter unter dem US Patent #2,656,508 patentieren (Coulter, 1953). Nach ihm ist das Coulter Prinzip benannt, gemäß welchem in einer leitenden Flüssigkeit gelöste Partikel, z.B. Blutzellen, im elektrischen Feld anhand der elektrischen Impedanz gezählt und ihre Größe bestimmt werden können. Die Innovation bestand darin, dass eine benutzerunabhängige Zell-für-Zell-Zählung ermöglicht wurde und gleichzeitig die Volumenverteilung genau gemessen werden konnte (Ruhenstroth-Bauer und Zang, 1960). 1965 wurde die Zellseparierung auf der Basis des Coulter Prinzips von Fulwyler eingeführt, um Zellen in einer Suspension zu sortieren. Das Gerät konnte 500–1000 Zellen pro Sekunde analysieren und bis zu 50% isolieren (Fulwyler 1965).

Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie wurde 1968 von Göhde entwickelt und kam als erster kommerzieller Durchflusszytometer 1969 als ICP 11 von Phywe, Göttingen auf den Markt (cyto.purdue.edu, 2013). Ein weiterer Meilenstein in der Entwicklung des Durchflusszytometers ist das fluorescence-activated cell sorting (FACS), welches die Detektierung von Zellen mittels spezifischer Lichtstreuung und Fluoreszenzcharakteristika und anschließend die Sortierung der Zellen anhand ihrer Ladung im elektrischen Feld in verschiedene Behälter erlaubt. Die Analyse und Sortierung von Zellen mit dem FACS von Herzenberg und Kollegen (Herzenberg et al., 1976) ist seit der Erfindung in den 1970er Jahren bis heute im Wesentlichen unverändert (Herzenberg et al., 2002). FACS ist ein geschützter Name von Becton, Dickinson and Company.

Positive Auswirkungen auf die Durchflusszytometrie hatte die Entwicklung und der Einsatz von Computern in den Sechzigerjahren. Heutzutage ist die Durchflusszytometrie im hohen Grade computergesteuert. Leistungsstarke Rechner ermöglichen optimale Messbedingungen, automatische Datenspeicherung, Darstellung der Messergebnisse in Listen oder als Graphen, automatische Analysen und das Erstellen eines Reports (Giaretti, 1997). Moderne Durchflusszytometer haben einen hohen Durchsatz, denn sie

analysieren mehrere tausend Zellen pro Sekunde in Echtzeit und können Zellen mit bestimmten Eigenschaften aussortieren. Des Weiteren wurden Durchflusszytometer mit mehreren Laserkomponenten und Fluoreszenzdetektoren entwickelt. So hat der MoFlo Astrios HIGH Speed-Sorter 7 Laser und kann 49 Fluoreszenzen detektieren, 30 davon simultan. Der Image-Stream-X von Raytest ist in der Lage, mit integriertem Fluoreszenzmikroskop eine visuelle Darstellung und Bildspeicherung der zu untersuchenden Zellen zu ermöglichen (Zähringer, 2011).

1.3.2 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist die wichtigste Methode zur Erhebung von Informationen über einzelne Zellen innerhalb einer heterogenen Probe. Darüber hinaus bietet sie eine hohe Messgeschwindigkeit (Jahan-Tigh et al., 2012). Durchflusszytometrische Messungen können an verschiedenen Geweben durchgeführt werden, u.a. an peripheren Blutstammzellproben, Knochenmark und Zellkulturlinien (Macey, 2007). Dabei ist die Durchflusszytometrie die Methode der Wahl zur Zählung von CD34+ hämatopoetischen Stamm– und Progenitorzellen (Macey, 2003). Die Quantifizierung ist wichtig für die Bestimmung des Zeitpunktes der Apherese sowie für die Beurteilung eines Apheresats, um ein erfolgreiches Engraftment zu sichern (Macey, 2003). Die Durchflusszytometrie ist die zuverlässigste Methode zur korrekten Messung des Engraftmentpotenzials, der Zusammensetzung der zellulären Transplantate und zum Monitoring des Beginns der Zytapherese (Gutensohn et al., 2000; Gratama et al., 2001; Lamb, 2002).

Um den wachsenden Anforderungen der klinischen Anwendungen gerecht zu werden, wurde die Durchflusszytometrie in den vergangenen Jahren zunehmend verbessert (Sutherland et al., 1996; Gratama et al., 2001).

Die Durchflusszytometrie ist in der Lage gleichzeitig mehrere Messungen an jeder Zelle durchzuführen und damit im Stande, eine Subpopulation in einer heterogenen Population zu identifizieren, zudem sind die Messwerte hoch sensitiv und reproduzierbar (De Rosa et al., 2001). Dabei handelt es sich um ein System, das aus drei funktionellen Einheiten besteht:

1. Aus einem Laser und einem Detektor für die optische Umsetzung,
2. einem hydraulischen System, das die Passage jeder einzelnen Zelle für die Messung sichert und den Probenstrom im Zentrum stabilisiert, was als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet wird,

3. und einem Computersystem, das die elektrischen Signale umsetzt und die Daten speichert.

Während sich eine Zelle in der Messkammer befindet und der Laserstrahl auf sie prallt, werden mehrere Signale wie Forward Scatter (FSC), Sideward Scatters (SSC) und die Fluoreszenzbanden gleichzeitig erzeugt und gemessen (Cho et al., 2010).

Sobald ein Laserstrahl auf eine Zelle trifft, wird dieser Strahl in alle Richtungen gestreut (Macey, 2003). Die Größe einer Zelle wird mit Hilfe des FSC bestimmt (Darzynkiewicz et al., 1990; Macey, 2003; Nguyen et al., 2007). Das Streulicht wird in einem Winkel von 0,5–10° Grad mit einem Sensor gemessen, der sich auf der gegenüberliegenden Seite der 488-nm/blue Laserquelle befindet (Jahan-Tigh et al., 2012). Dabei wird es von der Querschnittsfläche der Zelle beeinflusst, das heißt, dass große Zellen einen großen und kleine Zellen einen kleinen FSC besitzen (Giaretti, 1997). Da die Zellen während der hydrodynamischen Fokussierung von einem Hüllstrom umschlossen und zentriert werden, erlaubt dies die Messung jeder einzelnen Zelle.

Die Granularität, die die extra- und intrazellulären Bestandteile umfasst, wird mit Hilfe des SSC bestimmt, wobei die Streuung des Laserlichts im rechten Winkel mittels einer Serie an Sensoren detektiert wird. Des Weiteren können Antigene von Zellen mit an Antikörper gekoppelten Fluorochromen bestimmt werden. Die Fluorochrome absorbieren die Laserenergie und emittieren es wieder in Form ihrer spezifischen Wellenlänge. Diese so entstandenen Fluoreszenzen können mit dem optischen System, den Photodetektoren, detektiert und in elektrische Impulse umgewandelt werden, die dann von einer speziellen Software gelesen werden (Jahan-Tigh et al., 2012).

Alle erfassten Signale werden im Computersystem abgespeichert und stehen zur Auswertung bereit. In einem Dot-Plot, der graphischen Darstellung der Messergebnisse, werden auf der X-Achse der Forward Scatter und auf der Y-Achse der Sideward Scatter aufgetragen. Jeder Punkt in einem Dot-Plot entspricht einem Ereignis, wobei anhand der Anhäufungen Zellen mit ähnlichen Streulichteigenschaften zu erkennen sind. Aufgrund der großen Bandbreite der fluoreszierenden Signale werden die Fluoreszenzmessungen hingegen normalerweise logarithmisch dargestellt (Herzenberg et al., 2006).

1.3.3 CD34-Antigen

Das CD34-Antigen ist der bedeutendste Parameter zur durchflusszytometrischen Messung hämatopoetischer Vorläuferzellen (Gutensohn und Serke, 1996). Es handelt sich dabei um ein transmembranes, hochglykosyliertes Einzelketten Antigen vom Typ 1 mit einem Molekulargewicht von etwa 110kDa (Sutherland et al., 1992). Dieses Antigen wird in unreifen hämatopoetischen Stammzellen gebildet und nimmt im Laufe der Zelldifferenzierung fortlaufend ab bis es schließlich völlig verschwindet (Civin et al., 1984). Das CD34-Gen ist auf dem Chromosom 1q32 kodiert (Molgaard et al., 1989; Tenen et al., 1990).

Über die genaue Funktion von CD34 ist bisher wenig bekannt (Furness et al., 2006). Es ist bekannt, dass das CD34-Antigen vom Endothel der Lymphknoten exprimiert wird und als wichtiges Adhäsionsmolekül für T-Zellen dient. Die T-Zellen können über eine L-Selectin-CD34-Bindung in die Lymphknoten eintreten. Des Weiteren ist das CD34-Antigen in vaskulären Endothelzellen, im areolären Gewebe und im fetalen und adultem Nervengewebe nachzuweisen. Darüber hinaus blockiert CD34 die Mastzelladhäsion und begünstigt zudem die Dilatation der Blutgefäße (Fina et al., 1990; Lin et al., 1995; Wikipedia, 2011).

1.3.4 CD45-Antigen

Alle Zellen hämatopoetischen Ursprungs, ausgenommen sind Thrombozyten und Erythrozyten, exprimieren das Glykoprotein CD45-Antigen (Dalchau et al., 1980). Das CD45-Antigen ist ein sogenannter Pan-Leukozyten-Marker, welcher in unterschiedlicher Intensität von polymorphkernigen Zellen, Monozyten und Lymphozyten exprimiert wird (Brando et al., 2000). Die verschiedenen Moleküle dieser Antigenfamilie unterscheiden sich durch ihre Glykosylreste, die durch alternatives Splicing aus einem einzigen Gen entstehen. Sie sind jeweils spezifisch für bestimmte Zelltypen (Streuli et al., 1988; Thomas, 1989; Trowbridge, 1991).

1.3.5 Antikörper, Epitope und Fluorochrome

1984 produzierten Civin et al. den ersten monoklonalen Antikörper (My10) der das auf der Oberfläche von hämatopoetischen Vorläuferzellen lokalisiertes CD34-Antigen erkennt (Civin et al., 1984). CD34 monoklonale Antikörper erkennen Epitope, von denen drei Klassen beschrieben worden sind, deren Basis die unterschiedlichen Enzymsensitivitäten zu Grunde liegen. Klasse-1-Epitope sind gegenüber Glykoprotea-

sen, Chymopapain und Neuramidasen empfindlich, wobei Klasse-2-Epitope lediglich gegen Glykoproteasen und Chymopapain empfindlich sind (Arseniev et al., 1999). Klasse-3-Epitope zeigen für beide Enzyme eine Unempfindlichkeit. Da das CD34-Antigen negativ geladen ist und unterschiedliche Glykoformen besitzt, eignen sich einige monoklonale Antikörper und Fluorochrome nicht zum Nachweis des CD34-Antigens. Daher eignen sich beispielsweise fluoreszierende Isothiocyanate (FITC), die selbst negativ geladen sind, nicht zum Nachweis von Klasse-2-Epitopen, die ebenfalls negativ geladen sind (Sutherland et al., 1992; Barnett et al., 1999; Gratama et al., 2001).

Die monoklonalen Antikörper (mab) 8G12 und 581 haben sich in der Praxis als reproduzierbar und gut vergleichbar erwiesen. Diese monoklonalen Antikörper reagieren mit den Klasse-3-Epitopen des CD34-Antigens (Sutherland et al., 1992). PE-Konjugate werden für die Darstellung von CD34+ Zellen empfohlen, da sie die stärkste Fluoreszenz besitzen und sich aus diesem Grund sehr gut zur Darstellung von CD34+ Zellen eignen (Arseniev et al., 1999; Johnsen, 1995). Der ideale Emissionsbereich der PE-Konjugate von etwa 530nm interferiert mit dem der FITC-Konjugate, wobei die stärkste zelluläre Autofluoreszenz erreicht wird (Gutensohn et Serke, 1996). Weitere Vorteile von PE-Konjugaten sind die bessere Abgrenzung zwischen CD34+ und CD34– Zellen, die reduzierte Bindung an FC-Rezeptoren und toten Zellen (Barnett et al., 1999). PE wird im Verhältnis 1:1 an Antikörper gekoppelt, FITC im Verhältnis 1:5 bis 1:10, wobei dieses Verhältnis die F/P-Ratio angibt, die abhängig von den Antikörperchargen wechseln (Gutensohn et Serke, 1996).

Es sollten Pan-CD45 Antikörper konjugiert mit FITC genutzt werden, die alle Iso- und Glykoformen auf dem CD45-Antigen erkennen, da sich das FITC-Konjugat durch eine gute Unterscheidung zwischen CD45+ und CD45– Zellen bewährt hat (Keeney et al., 1998; Barnett et al., 1999).

1.3.6 Stem-Kit

Bei dem Stem-Kit (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) handelt es sich um ein Verfahren, das auf dem ISHAGE Protokoll für die Identifizierung von hämatopoetischen Stammzellen basiert. Es beinhaltet einen CD45-FITC monoklonalen Antikörper und einen CD34-PE monoklonalen Antikörper, die in einer Kombination zur Verfügung gestellt werden. Darüber hinaus enthält das Kit den Vitalitätsfarbstoff 7-Amino-Actinomycin (7-AAD). Dieser Vitalitätsfarbstoff erlaubt die Unterscheidung vitaler und toter Zellen, da sich dieser bei beschädigter Zellmembran zwischen die Basenpaare der DNS, insbe-

sondere zwischen die Basenpaare Cytosin und Guanin, legt. Somit handelt es sich bei 7-AAD-positiven Zellen um beschädigte oder abgestorbene Zellen und bei 7-AAD-negativen Zellen um vitale Zellen. Des Weiteren enthält das Stem-Kit eine Lyselösung, die auf zehnprozentiger NH_4Cl-Lösung basiert.

Bei dem letzten Reagenz handelt es sich um StemCount-Beads. Diese ermöglichen eine indirekte Messung der absoluten CD34+ Zellzahl. Hierbei wird eine bekannte Anzahl von fluoreszierenden Beads im Durchflusszytometer analysiert und das Zahlenverhältnis zwischen Beads und CD34+ Zellen ermittelt, wodurch die absolute CD34+ Zellzahl auf einer Single-Platform durchgeführt werden kann (Keeney et al., 2004b).

1.3.7 Gating-Strategie und Auswertung der Durchflusszytometrie

Die Triggerparameter Forward Scatter (FSC), Sideward Scatter (SSC), CD34 und CD45 spielen die entscheidende Rolle in der durchflusszytometrischen Analyse.

Die CD45 Expression wird für die sequentielle Gating-Strategie genutzt, um CD34+ Zellen zu identifizieren (Keeney et al., 1998). Für die Kontrolle der korrekten Positionierung des Triggers ist die korrelierende Darstellung von FSC gegen die CD45-Expression (Dot-plot) notwendig. Des Weiteren sind die Korrelationen SSC gegen CD45, SSC gegen CD34, und CD45 gegen CD34 von Bedeutung. SSC gegen CD45 grenzt die Zellen ein, die als Leukozyten definiert sind. Um die Region der CD34-exprimierenden Zellen zu erhalten, wird der PE-CD34-Antikörper im Dot-plot gegen den SSC aufgetragen (Gutensohn et Serke, 1996).

In Zytapherese produkten finden sich häufig Thrombozyten, die durch den SSC nicht wesentlich von kleinen Lymphozyten unterschieden werden können, jedoch einen deutlichen Unterschied im Bezug zu ihrem FSC zeigen (Gutensohn et Serke, 1996).

Wird das Gate in der Durchflusszytometrie so eingestellt, dass Events, die unterhalb des FSC Thresholds liegen, ausgeschlossen werden, hat dies zur Folge, dass keine apoptotischen Zellen, subzelluläre Partikel, Thrombozyten und Erythrozyten gemessen werden (Gisselo et al., 2002). Dies wiederum hat den Vorteil, dass apoptotische Zellen und subzelluläre Partikel nicht fälschlicherweise als Leukozyten gezählt werden und so zu einer falsch hohen Anzahl von CD34+ Zellen führen. Automatischen Zellzählungen kann dieser Fehler jedoch unterlaufen (Gisselo et al., 2002).

Bei der Knochenmarkregeneration und der zytoreduktiven Therapie ist jedoch darauf zu achten, dass einige CD34+ Zellen sehr niedrige CD45-Level exprimieren (Barnett et al., 1999).

1.3.8 Dual- und Single-Platform-Methode sowie ISHAGE-Protokoll

Das erste Dual-Platform-Verfahren zur Zählung CD34+ Stammzellen wurde 1994 entwickelt und als das Milan-Protokoll vorgestellt (Brando et al., 2000; Ngoma et al 2011). Dieses Verfahren gebraucht neben dem Durchflusszytometer einen hämatologischen Analysator für die absolute Leukozytenzählung und gibt somit den Prozentsatz einer gegebenen Teilmenge von Zellen unter der gesamten Leuko- oder Lymphozytenzahl an (Keeney et al., 1998; Gratama et al., 2001; Ngoma et al., 2011).

Im Gegensatz zum Dual-Platform-Verfahren bietet das Single-Platform-Verfahren die Möglichkeit, die absolute CD34+ Zellzahl in einer Blutprobe anzugeben (Keeney et al., 1998), indem es die Zellen von Interesse, in diesem Falle die CD34+ Stammzellen, in einem genau bestimmten Volumen, mit Hilfe von Antikörpern oder eines Zellfarbstoffes, identifiziert und kontaminierte Zellen ausschließt, ohne dabei eine Referenzgruppe zu benutzen. Diese identifizierten CD34+ Stammzellen stehen somit in direkter Beziehung zum originalen Blutvolumen (Brando et al., 2000; Gratama et al., 2001; Keeny et al., 2000). Das Single-Platform-Verfahren kann entweder volumetrisch oder auf der Basis von Mirkopartikeln (Beads) erfolgen (Gratama, 2001). Die Beads-basierte Technologie wurde 1982 konzipiert (Stewart et Steinkamp, 1982).

Mitte der Neunzigerjahre haben etliche Studien die Notwendigkeit einer Standardisierung für die Zählung von CD34+ Zellen verdeutlicht. Eine 2-Farben Methode wurde entwickelt, in der HPC als CD34 (hell), CD45 (dunkel), FSC (niedrig bis intermediär) und SSC (niedrig) definiert wurde. Diese Methode wurde von der International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) in ihre Leitlinien übernommen und später für die Single-Platform-Methode modifiziert (Keeney et al., 1998; Keeney et al., 2004a). Vor allem die Einführung des Single-Platform-Verfahrens und die Verwendung von Viabilitäts-Farbstoffen erbrachten bessere Informationen für die Transplantations-Zentren, da die Verwendung von automatisierten Hämatologieanalysatoren umgangen und stattdessen die wichtigen Parameter allein von der durchflusszytometrischen CD34+ Zell-Quantifizierung abgeleitet werden konnten (Sutherland, 1997; Keeney et al., 1998; Sutherland et al., 2009). Das Single-Plattform-Verfahren wird mit fluoreszierenden Beads und unter der Ergänzung des Farbstoffes 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) durchgeführt (Sutherland et al., 2009), welche den Ausschluss von toten Zellen während der Analyse erlauben (Keeney et al., 2004a), was nach heutigen Erkenntnissen jedoch diskutiert wird (Fritsch, 2012). Eine bekannte Menge an fluoreszierenden Beads wird einem bekannten Volumen von gefärbtem Blut beigemengt. Die Beads wer-

den zusammen mit den Zellen gezählt, um deren Anzahl pro Mikroliter zu berechnen. Diese Methode ist von Lyse- und Antikörpervolumen unabhängig (Brando et al., 2000).

Das ISHAGE-Protokoll hat einen bedeutsamen Einfluss auf die Genauigkeit und Zuverlässigkeit gezeigt (Sutherland et al., 2009), jedoch garantiert die Implementierung von standardisierten Protokollen keine genaue Messung (Lysak et al., 2010). Dieses Protokoll wurde von Anfang an, herstellerunabhängig, für den Gebrauch von Durchflusszytometern entwickelt (Sutherland et al., 2009).

Studien bestätigen die Genauigkeit der CD34+ Zellzählung durch die auf fluoreszierenden Mikropartikeln basierte Single-Platform-Methode (Schlenke et al., 1999). Dabei werden Beads – lyophilisierte fluoreszierende Kunststoffpartikel – in bekanntem Volumen und exakt überprüfter Konzentration in eine Blutprobe pipettiert und mit dem Durchflusszytometer gemessen. Da die Konzentration der fluoreszierenden Beads bekannt ist, kann die absolute CD34+ Zellzahl errechnet werden. Dabei kann dieses Ergebnis vom Durchflusszytometer selbst hergeleitet werden, indem er das Verhältnis von Beads zu CD34+ Zellen misst (Keeney et al., 1998).

Die Single-Platform-Analyse hat sich gegenüber der Dual-Platform-Analyse aufgrund ihrer guten Vergleichbarkeit zwischen den Laboratorien bewährt (Gratama et al., 2001) und wird unter anderem aus diesem Grund empfohlen (Moretti et al., 2002). Hinsichtlich der fluoreszierenden Beads im Single-Platform-Verfahren kann hier auf ein zweites Gerät, den hämatologischen Ana-lysator, verzichtet werden. Das Single-Platform-Verfahren ist schnell, einfach, akkurat (Keeney et al., 1998) und besitzt gegenüber der Dual-Platform-Methode eine geringere Möglichkeit abweichender Ergebnisse (Brando et al., 2000).

Unter dem aktuellen Single-Plattform-Verfahren müssen die Proben allerdings noch weiter verarbeitet werden, zudem müssen verschiedene Anpassungen für genaue Messungen im Labor gewährleistet werden. Außerdem beruhen die aktuellen Single-Platform-Verfahren auf der exakten Zugabe von Beads bei einer bestimmten Konzentration. Kürzlich wurde ein Durchflusszytometer eingeführt, das direkte volumetrische Zellanalysen und quantitative Analysen ermöglicht ohne den Zusatz von künstlichen Beads (Accuri.com, 2010).

1.3.9 Colony Forming Units

Eine alternative Form der CD34-Zählung, die Abschätzung von hämatopoetischen Progenitorzellen in sogenannten Colony-Forming-Units (CFU), steht zwar in Beziehung zu dem CD34-Level, jedoch fehlt es ihr an Reproduzierbarkeit und die Analysezeit ist verlängert (Barnett et al., 1999). Intercenter-Variationskoeffizienten für die CFU-Zählung betragen ca. 30%. Ferner gibt es keine geeignete Möglichkeit, die Ungenauigkeit in der CFU-Zählung zu minimieren (Serke et al., 1997). Die CFU-GM (Colony-Forming-Units–Granulocyte/Macrophage) unterscheiden sich von Patient zu Patient, nicht aber zwischen Leukaphereseprodukten des gleichen Patienten (Yang et al., 2005).

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv und Blutproben

In dieser Studie wurden drei verschiedene Materialien verwendet. Neben Restmaterial der routinemäßigen Laboruntersuchung von Zytaphereseprodukten und kryokonservierten Proben, die von Apheresepodukten nach dem Auftauen stammten, wurden Proben aus peripherem venösem Blut untersucht.

In der Gruppe, in welcher die Proben aus dem peripheren Blut der Patienten bzw. Spender stammten, litten fünf Patienten an einem multiplen Myelom (MM) und sechs an einem Non-Hodgkin-Lymphom (NHL). Die übrigen drei Proben stammten von gesunden Spendern. Die Apheresat-Gruppe beinhaltete vier Proben von drei Patienten mit einem multiplem Myelom, zwei Patienten mit einem Non-Hodgkin-Lymphom und drei gesunden Spendern. In der Gruppe der aufgetauten Proben waren fünf Patienten an einem Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) und drei Patienten an einem multiplen Myelom erkrankt.

Die 14 Proben, die vor der extrakorporalen Zellsammlung von Probanden aus dem peripheren Blut gesammelt wurden, stammten von elf männlichen Patienten und drei weiblichen gesunden Spendern. Das Durchschnittsalter der Patienten lag im Mittelwert bei 52 Jahren (28 bis 67 Jahre), das Durchschnittsalter der gesunden Spender lag im Mittelwert bei 45 Jahren (41 bis 54 Jahre).

Insgesamt wurden in der Apheresat-Gruppe neun Proben untersucht. Darunter befanden sich sechs Proben aus sechs verschiedenen Apheresepodukten von fünf männlichen Patienten mit einem Durchschnittsalter von 54 Jahren (52 bis 67 Jahre) sowie drei Proben von zwei gesunden weiblichen Spenderinnen und einem gesunden männlichen Spender mit einem Durchschnittsalter von 41 Jahren (26 bis 54 Jahre).

Des Weiteren wurden in den Gruppe der kryokonservierten Proben 13 Proben aus 13 verschiedenen Produkten von neun Apheresaten, von acht verschiedenen Patienten stammend, getestet, wobei es sich um eine weibliche Patientin und sieben männliche Patienten mit einem Durchschnittsalter von 60,5 Jahren (53 bis 68 Jahre) handelte.

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der Patienten bzw. Spender.

	Probenmaterial		
	Apherese-proben	**kryokonservierte Proben**	**Periphere Blutproben**
Multiples Myelom	4	3	5
Non-Hodgkin-Lymphom	2	5	6
Gesunder Spender	3	-	3
Insgesamt:	**9**	**8**	**14**

Die gesunden Spender erhielten zweimal täglich 5 µg/kg KG G–CSF (Neupogen®, Amgen, Thousand Oaks, CA, USA) subkutan. Die erste Apherese wurde am fünften Tag der Mobilisation durchgeführt.

Die Mobilisierung der hämatopoietischen Progenitorzellen vor Chemotherapie wurde täglich mit 5-10 µg/kg KG G-CSF durchgeführt. Für die Chemotherapien wurde eine Vielzahl an Medikamenten verwendet, die sich nach etablierten Studienprotokollen richteten (z.B. Cyclophosphamid, Ifosfamid, Epirubicin, Etoposid, Carboplatin, Dexamethason, hochdosiertes Cytosinarabinosid [ara-C], Cisplatin, Carmustin oder Melphalan).

2.2 Probenvorbereitung: Apheresate, peripheres venöses Blut

Die Patientenproben wurden sowohl mit dem Zytometer Epics XL (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) als auch mit dem Accuri C6 (Accuri Cytometers, Ann Arbor, MI, USA [2011 aufgekauft durch Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA]) nach den für die Single-Platform geltenden ISHAGE-Vorgaben analysiert (Sutherland et al., 1996; Keeney et al., 1998). Die Proben wurden mit dem Stem-Kit (Beckman Coulter) vorbereitet. Das Stem-Kit beinhaltet einen CD45-Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-konjugierten monoklonalen Antikörper (mAb J33), einen CD34-Phycoerythrin-Antikörper (mAb 581), sowie jeweils einen isoklonen Kontroll-Antikörper und den Viabilitätsfarbstoff 7-Aminoactinomycin A (7-AAD).

Die identische Vorbereitung von drei Röhrchen erfolgte in mehreren Arbeitsschritten, wobei das dritte Röhrchen der Kontrolle diente. Bei Prozessierung von Vollblut wurde aufgrund der hohen Absorption durch Hämoglobin kein Lichtschutz benötigt (Gutensohn et Serke, 1996). In den ersten beiden Schritten wurden den Röhrchen

jeweils 20µl CD45-FITC/CD34-PE und 7-AAD hinzugefügt. Daraufhin wurden je 100µl Probelösung hinzugegeben. Danach wurden die Proben für fünf Sekunden gevortext (Bio Vortex V1, lab4you GmbH, Berlin, Deutschland), wobei auf die eingestellte Frequenz geachtet wurde, da diese Einfluss auf die Vitalität der Zellen und die Bindung der Antikörper hat (Gutensohn et Serke, 1996). Anschließend wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur (20±2°C) inkubiert. Im folgenden Schritt wurden 2ml einer Lyse, bestehend aus 10-%iger Amoniumchlorid-Lösung (NH4Cl), die mit destilliertem Wasser verdünnt worden war, hinzugegeben. Daraufhin wurden die Proben erneut für fünf Sekunden gevortext (Bio Vortex V1) und für zehn Minuten inkubiert. Danach wurden 100µl StemCounts (Beckman Coulter) hinzugefügt. Da ein exakt definiertes Volumen in die drei Röhrchen revers pipettiert wurde, kann das Volumen indirekt anhand der Anzahl der Beads berechnet werden. Die Inkubationszeiten fanden zum Schutze der fluoreszierenden Antikörper im Dunkeln statt.

Nachdem das Lyse-Reagenz in die Probe pipettiert worden war, erfolgte umgehend die durchflusszytometrische Analyse. Sofern dies nicht möglich war, wurde die Probe maximal eine Stunde kühl gelagert (Barnett et al., 1999). Die Fixation diente der erhöhten Haltbarkeit der Probe, der Verbesserung der Zellstabilität und Streulichteigenschaften. Da es zu Veränderungen von Epitopen kommen kann, wurden die Zellen erst nach der Antikörperbindung mit gepufferten Formaldehydlösungen fixiert.

Mithilfe der StemCount-Beads kann eine indirekte Messung der absoluten CD34+ Zellzahl durchgeführt werden. Dabei werden die Beads zusammen mit den Zellen gezählt, deren Anzahl pro Mikroliter mit folgender Formel errechnet wird (Brando et al., 2000):

$$\text{Anzahl der Zellen/µL} = \frac{\text{(Anzahl der gezählten Zellen x Konzentration der } \textit{Beads}\text{)}}{\text{(Anzahl der gezählten } \textit{Beads}\text{)}}$$

Bei der Justierung des Durchflusszytometers wurde beachtet, dass die Betriebstemperatur erreicht wurde, da es sonst zu Messfehlern kommen kann (Gutensohn et Serke, 1996).

2.3 Kryokonservierte Proben

PBPC Transplantate wurden in Konzentrationen von 3.108–5.107 Zellen/ml auf -100°C in einem so genannten controlled rate freezer (Kryo10/II, Messer Cryotherm, Siegthal, Deutschland) nach der Zugabe eines gleichen Volumens aus 50% Hydroxyethylstärke

(HES 200/0.5 10%, Fresenius, Deutschland), 20% DMSO (WAK-Chemie, Deutschland), 10% ACD-A (Fresenius) und 20% autologem Plasma kryokonserviert.

Das controlled rate freezing, welches bei +8°C begann, ist ein Gefriervorgang, das in kontrollierten Intervallen die zu konservierenden Zellen einfriert, indem flüssiger Stickstoff in eine geschlossene Kammer gebracht wird, in welcher sich die Zellen befinden. Dieses Verfahren verhindert die zelluläre Dehydrierung und Eiskristallformationen (Encyclopædia Britannica, 2011). Im ersten Schritt des controlled rate freezings wurde die Kammer, bei einer Geschwindigkeit von -1°C/min, auf -18°C herab gekühlt. Daraufhin kühlte das System bei -50°C/min auf -80°C herab, um im anschließenden Schritt bei +50°C/min auf -34°C aufzuwärmen. Diese Temperatur wurde für neun Minuten gehalten. Der weitere Kühlprozess verlief bei -2,1°C/min auf -55°C und abschließend wurde bei einer Geschwindigkeit von -3,75°C/min auf eine Temperatur von -100°C herabgekühlt. Nach Beendigung dieses Kryokonservierungsverfahrens wurden der Transplantbeutel und die Satellitenöhrchen in der Gasphase des flüssigen Stickstoffs gelagert. Sowohl die Temperatur im Lagerbehältnis als auch die Menge an flüssigem Stickstoff wurden permanent kontrolliert (Biosafe Control ® und Adurb Automatic Filling Device, Messer Cryotherm, Siegthal, Deutschland), um zu gewährleisten, dass die Temperatur unter dem Deckel stets unter -150°C lag.

Nach mindestens 24 Stunden Lagerung der Proben unter diesen Bedingungen wurden sie einem Flüssigstickstoffbehälter entnommen und manuell in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut (Humpe, et al., 2005). Daraufhin wurden die Proben in einem 1:10 Verhältnis mit Hilfe einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS; Gibco, Darmstadt, Deutschland) und eines zehnprozentigen AB-Serums (Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) verdünnt. Die Inkubationszeit der kryokonservierten Proben mit den monoklonalen Antikörpern CD34-PE und CD45-FITC wurde hier auf zehn Minuten reduziert, da diese die Wiederfindungsrate der CD34+ oder CD45+ Zellen nicht signifikant beeinflusst (Humpe et al., 2005).

Unmittelbar nach der Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffs wurde die Suspension aus jeder der drei Röhrchen aufgeteilt. Die Proben wurden gevortext. Anschließend wurden Datenerfassung und -analyse gestartet, wobei beide Durchflusszytometer parallel arbeiteten. Für die Auswertung der Dateien wurde der StemONE Algorithmus verwendet.

2.4 Die verwendeten Durchflusszytometer

In dieser Studie wurden zwei Durchflusszytometer verwendet. Dabei arbeitet der Epics XL Bead-basiert, der Accuri C6 hingegen volumetrisch. Da der Accuri C6 eine direkte volumetrische Messung ermöglicht, ohne dabei auf Beads angewiesen zu sein, sind eine direkte Kalkulation der Zellkonzentration möglich und die Bead-assoziierten Störfaktoren der Messungen ausgeschlossen. Die Genauigkeit des Single-Platform-Verfahrens ist von der Technologie des Durchflusszytometers abhängig (Brando et al., 2000).

Das Durchflusszytometer von Accuri C6 hat die Maße 27,9 x 36,3 x 41,9 cm und ein Gewicht von 13,6 kg, während der Epics XL 50,8 x 61,0 x 57,2 cm misst und 63,5 kg wiegt.

Neben der Reagenzien und der Durchflusszytometer können sowohl die Software als auch die Gating-Strategie zusätzlich Einfluss auf die Messergebnisse nehmen (Barnett et al., 2000).

2.5 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse wurden neben Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) das Softwareprogramm GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA) verwendet.

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Daten als Minimum, Maximum, Median und Range sowie als 95% Konfidenzintervall (CI) dargestellt. Die Analyse, inwiefern die zu vergleichenden Methoden übereinstimmen, wurde gemäß der Bland-Altman-Analyse (Bland et al., 1986) und durch Berechnung einer Spearman-Korrelation durchgeführt, unter der Annahme, dass keine Gauss-Verteilung vorlag. Gegebenenfalls wurden die Daten mit dem nichtparametrischen Wilcoxon-Test für gepaarte Daten verglichen. Ein p-Wert von ≤ 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

In dieser Studie wurden Messreihen von drei verschiedenen Materialien von CD34+ Zellen zum Vergleich der beiden durchflusszytometrischen Methoden herangezogen.

3.1 Analysen der peripheren Blutstammzellproben

In den 14 Blutstammzellproben aus peripherem venösem Blut betrug die Streubreite auf dem Accuri C6 für CD34+ Ereignisse 0–88 Zellen/µL und mit dem Epics XL 0–100 Zellen/µL. Der Median betrug für den Accuri C6 41 Zellen/µL, für den Epics XL 41,5 Zellen/µL (s. Tabelle 2).

Die Werte der beiden Durchflusszytometer korrelierten signifikant miteinander ($p < 0,01$) mit $r = 0,95$. Die Bland-Altman-Analyse zeigte jedoch, dass sich die Messergebnisse zwischen den beiden Durchflusszytometern insbesondere in CD34+ Proben mit weniger als fünf Zellen/µL unterscheiden.

Die Auswertung der Messergebnisse der CD45+ Proben ergab, dass die Ergebnisse des Accuri C6 und des Epics XL signifikant miteinander korrelieren ($p < 0,01$) mit $r = 0,996$. Das Accuri C6 lag im Median bei 5.065 Zellen/µL mit einer Streubreite von 770–68.996 Zellen/µL. Das Epics XL lag im Median bei 4.775 Zellen/µL mit einer Streubreite 807–70.782 Zellen/µL (s. Tabelle 2).

Das 95%-Konfidenzintervall zeigte eine fast vollständige Deckungsgleichheit sowohl für die CD34+ als auch die CD45+ Zellen an den getesteten Durchflusszytometern: CD34+ Zellen: 95% CI für Accuri C6 = 18–63 Zellen/µL; 95% CI für Epics XL = 19–67 Zellen/µL; CD45+Zellen: 95% CI für Accuri C6 = 3.525–26.755 Zellen/µL; 95% CI für Epics XL = 3.320–27.148 Zellen/µL.

Die Daten aus Tabelle 2 sind in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt.

Tabelle 2: Ergebnisse der peripheren Blutstammzellproben auf den Durchflusszytometern Accuri C6 und Epics XL

	CD34+ Zellen/µL (Accuri C6)	CD34+ Zellen/µL (Epics XL)	CD45+ Zellen/µL (Accuri C6)	CD45+ Zellen/µL (Epics XL)
Minimum	0	0	770	807
Maximum	88	100	68.996	70.782
Median	41,0	41,5	5.065	4.775
95%–CI	18 – 63	19 – 67	3.525 – 26.755	3.320 – 27.148

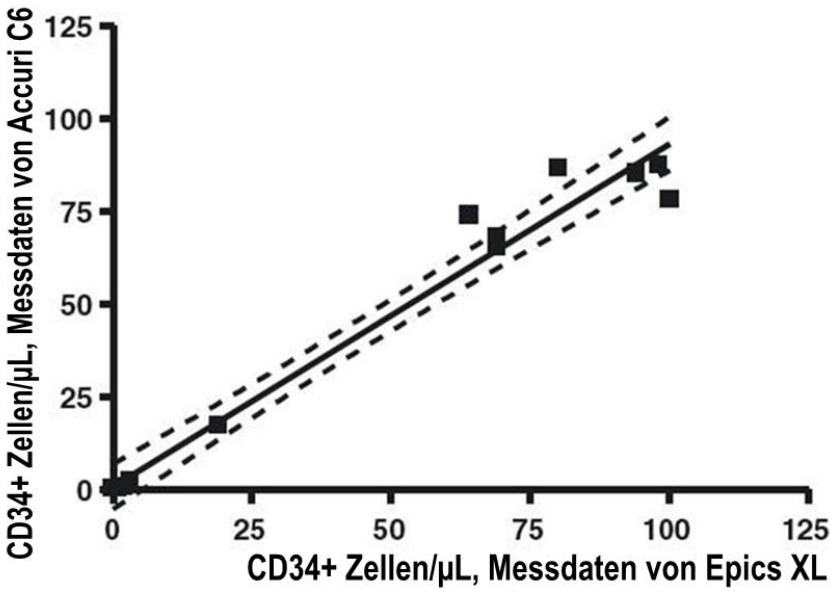

Abbildung 1: Vergleich der Messdaten von Accuri C6 und Epics XL mit Blutstammzellproben aus peripherem venösem Blut. Korrelationsdarstellung der Messdaten von Accuri C6 gegen Epics XL mit CD34+ Zellen/µL. Die Regressionskurve beträgt (y) = 0,93 * (x) + 0,68 (Gutensohn, Nikolitsis et al., 2012).
Gestrichelte Linie: 95% CI; durchgehende Linie: Regressionsgerade.

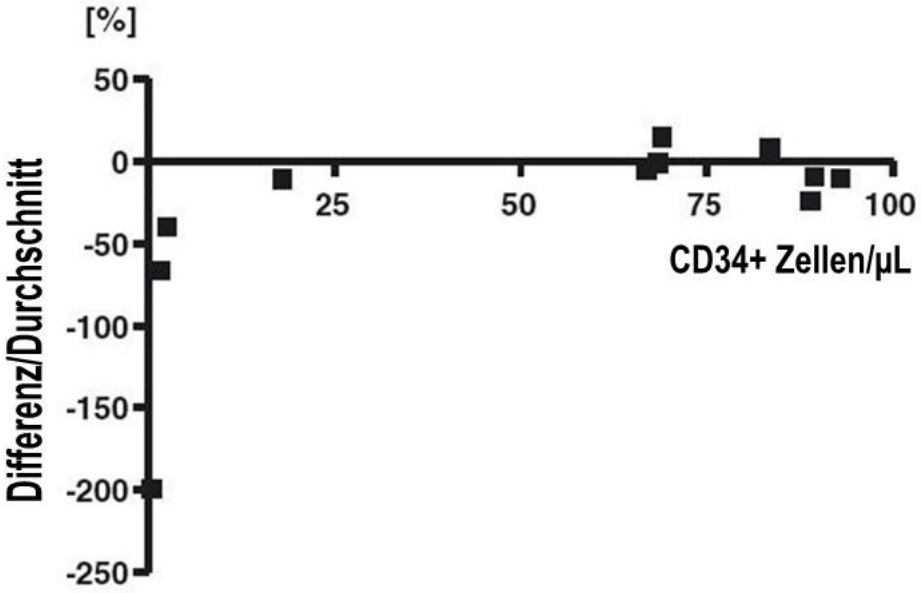

Abbildung 2: Vergleich der Messdaten von Accuri C6 und Epics XL mit CD34+ Blutstammzellproben aus peripherem venösem Blut. Darstellung der Bland-Altman-Analyse (Gutensohn, Nikolitsis et al., 2012).
Gestrichelte Linie: 95% CI; durchgehende Linie: Regressionsgerade.

3.2 Analysen der Apheresatproben

In den neun Apheresatproben betrug die Streubreite auf dem Accuri C6 für CD34+ Ereignisse 543–24.500 Zellen/µL und auf dem Epics XL 600–24.660 Zellen/µL. Der Median betrug für den Accuri C6 2.355 Zellen/µL und für den Epics XL 2.680 Zellen/µL. Die Werte der beiden Durchflusszytometer korrelierten signifikant miteinander ($p < 0,01$) mit $r = 0,933$.

Das 95%-Konfidenzintervall zeigte eine fast komplette Deckungsgleichheit für beide Parameter an den getesteten Durchflusszytometern: CD34+ Zellen: 95% CI für Accuri C6 = (-)424–11.128 Zellen/µL; 95% CI für Epics XL = (-)313–11.244 Zellen/µL.

Die Bland-Altman-Analyse ergab eine gute Übereinstimmung der Messergebnisse der beiden Durchflusszytometer. Es zeigte sich eine geringfügige Abweichung der Messdaten im Bereich von niedrigen CD34+ Zellzahlen.

Die Messdaten zwischen Accuri C6 und Epics XL für CD45+ Zellen korrelieren nicht signifikant ($p = 0,097$) mit $r = 0,60$. Der 95%-Konfidenzintervall zeigte jedoch mehrheitlich Deckungsgleichheit auf: 95% CI für Accuri C6 = 270.285–560.808 Zellen/µL; 95%-

CI für Epics XL = 3.286.652–623.381 Zellen/µL. Die Bland-Altman-Analyse für CD45+ Messungen zeigte keine großen Deviationen.

Die Daten aus Tabelle 3 sind in den Abbildungen 3 und 4 veranschaulicht.

Tabelle 3: Ergebnisse der Apheresatproben auf den Durchflusszytometern Accuri C6 und Epics XL.

	CD34+ Zellen/µL (Accuri C6)	**CD34+ Zellen/µL (Epics XL)**
Minimum	543	600
Maximum	24.500	24.660
Median	2.355	2.680
95%–CI	(-)424 – 11.128	(-)313 – 11.244

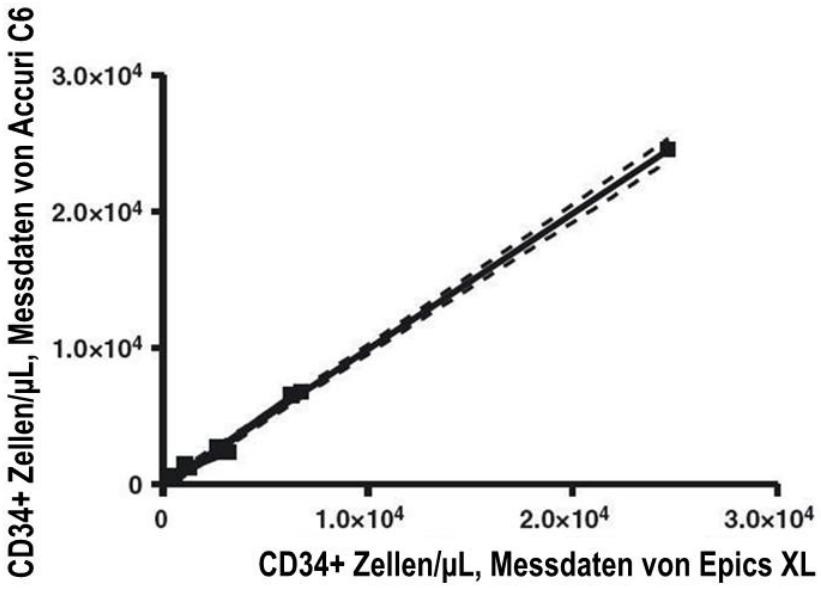

Abbildung 3: Vergleich der Messdaten von Accuri C6 und Epics XL mit Apheresatproben. Korrelationsdarstellung der Messdaten von Accuri C6 gegen Epics XL mit CD34+ Zellen/µL. Die Regressionskurve beträgt (y) = 1,0 * (x) − 105,7 (Gutensohn, Nikolitsis et al., 2012).
Gestrichelte Linie: 95% CI; durchgehende Linie: Regressionsgerade.

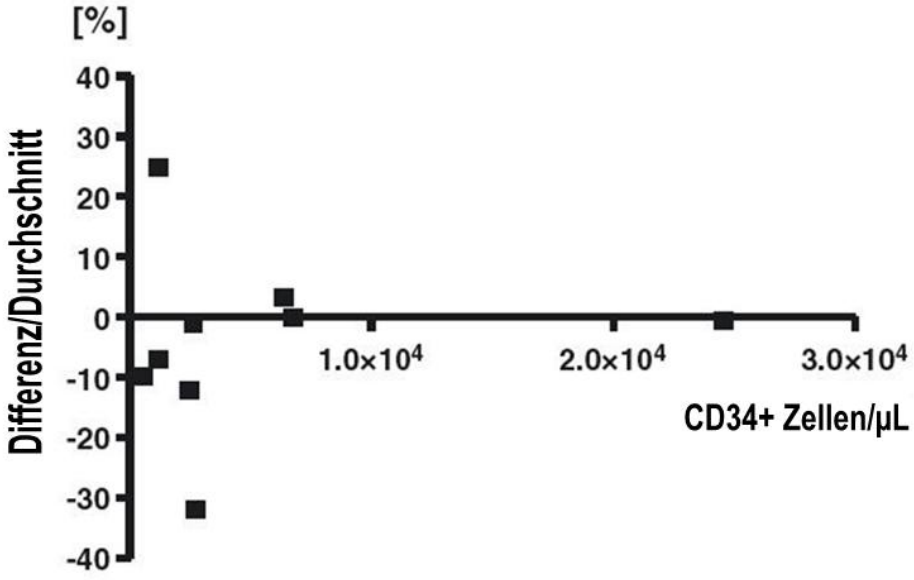

Abbildung 4: Vergleich der Messdaten von Accuri C6 und Epics XL mit CD34+ Apheresatproben. Darstellung der Bland-Altman-Analyse (Gutensohn, Nikolitsis et al., 2012).
Gestrichelte Linie: 95% CI; durchgehende Linie: Regressionsgerade.

3.3 Analysen nach Kryokonservierung aus aufgetauten Proben

Nach dem Auftauen der acht kryokonservierten Proben aus Apheresaten betrug die Streubreite auf dem Accuri C6 für CD34+ Ereignisse 650–6.544 Zellen/µL und auf dem Epics XL 680–6.220 Zellen/µL. Der Median betrug für den Accuri C6 2.399 Zellen/µL und für den Epics XL 2.170 Zellen/µL. Die Werte der beiden Durchflusszytometer korrelierten signifikant miteinander ($p < 0,01$) mit $r = 0,929$.

Die Bland-Altman-Analyse ergab eine gute Übereinstimmung der Messergebnisse der beiden Durchflusszytometer. Das 95%-Konfidenzintervall zeigte ebenfalls eine fast komplette Deckungsgleichheit für beide Parameter an den getesteten Durchflusszytometern (CD34+ Zellen: 95% CI für Accuri C6 = 1.562–4.224 Zellen/µL; 95% CI für Epics XL = 1.646–4.195 Zellen/µL).

Die Auswertung der CD45+ Ereignisse ergab keine großen Unterschiede und die Korrelation zwischen den beiden Durchflusszytometern war signifikant ($p < 0,01$) mit $r = 0,9$.

Die Viabilität aller Ereignisse, die mit dem Accuri C6 gemessen wurden, betrug 74,61% mit einer Streubreite von 70,27–88,78 %. Die Viabilität der CD45+ Zellen, die mit dem Epics XL gemessen wurden, betrug 75,75 % mit einer Streubreite von 70,55–92,20 %. Der 95%-Konfidenzintervall zeigte keine großen Unterschiede: 95% CI für Accuri C6 = 73,56–81,74 %; 95% CI für Epics XL = 74,53–83,88 %.

Die Daten aus Tabelle 4 sind in den Abbildungen 5, 6 und 7 veranschaulicht.

Tabelle 4: Ergebnisse der aufgetauten Apheresatproben auf den Durchflusszytometern Accuri C6 und Epics XL

	CD34+ Zellen/µL (Accuri C6)	**CD34+ Zellen/µL (Epics XL)**	**CD45+ Viabilität in % (Accuri C6)**	**CD45+ Viabilität in % (Epics XL)**
Minimum	650	680	70,27	70,55
Maximum	6.544	6.220	88,78	92,20
Median	2.399	2.170	74,61	75,75
95% CI	1.562 – 4.224	1.646 – 4.195	73,56 – 81,74	74,53 – 83,88

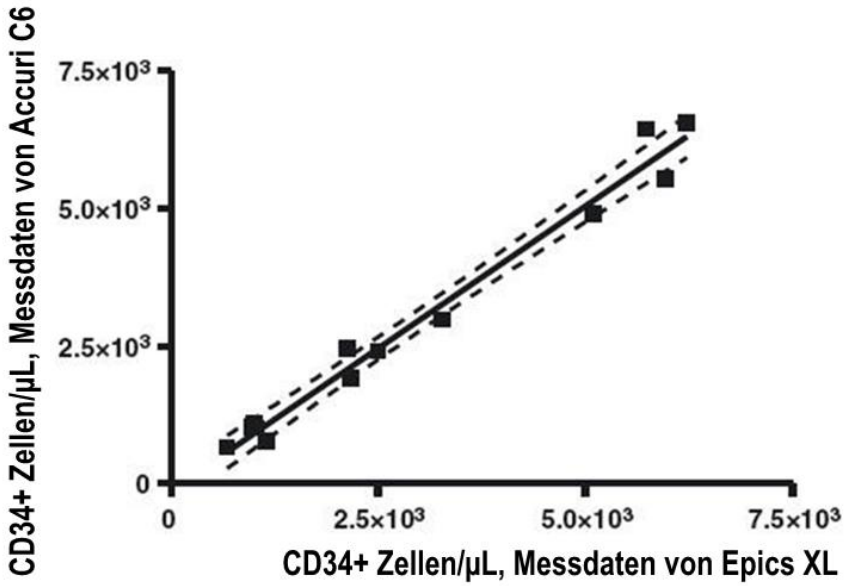

Abbildung 5: Vergleich der Messdaten von Accuri C6 und Epics XL mit aufgetauten Apheresatproben. Korrelationsdarstellung der Messdaten von Accuri C6 gegen Epics XL mit CD34+ Zellen/µL. Die Regressionskurve beträgt (y) = 1,034 * (x) - 126.6 (Gutensohn, Nikolitsis et al., 2012).
Gestrichelte Linie: 95% CI; durchgehende Linie: Regressionsgerade.

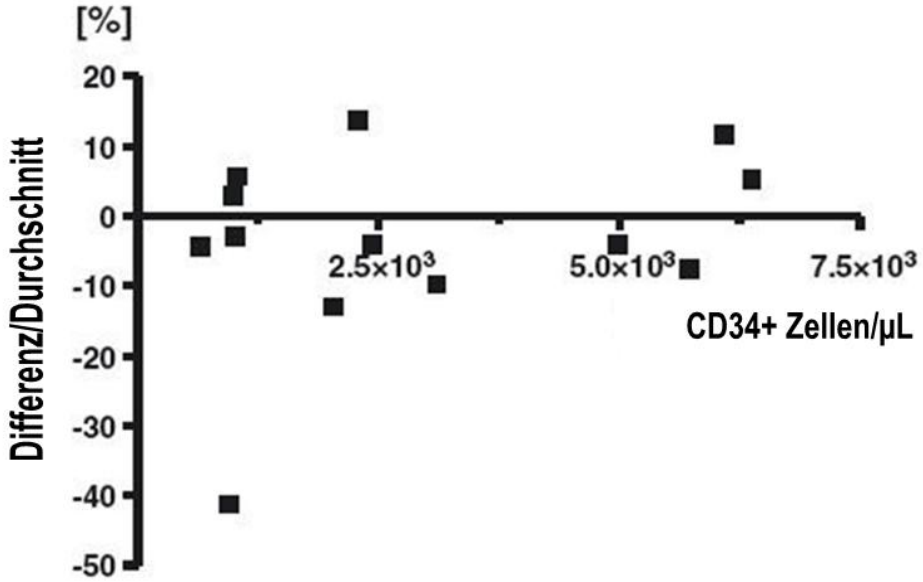

Abbildung 6: Vergleich der Messdaten von Accuri C6 und Epics XL mit CD34+ aufgetauten Apheresatproben. Darstellung der Bland-Altman-Analyse (Gutensohn, Nikolitsis et al., 2012).
Gestrichelte Linie: 95% CI; durchgehende Linie: Regressionsgerade.

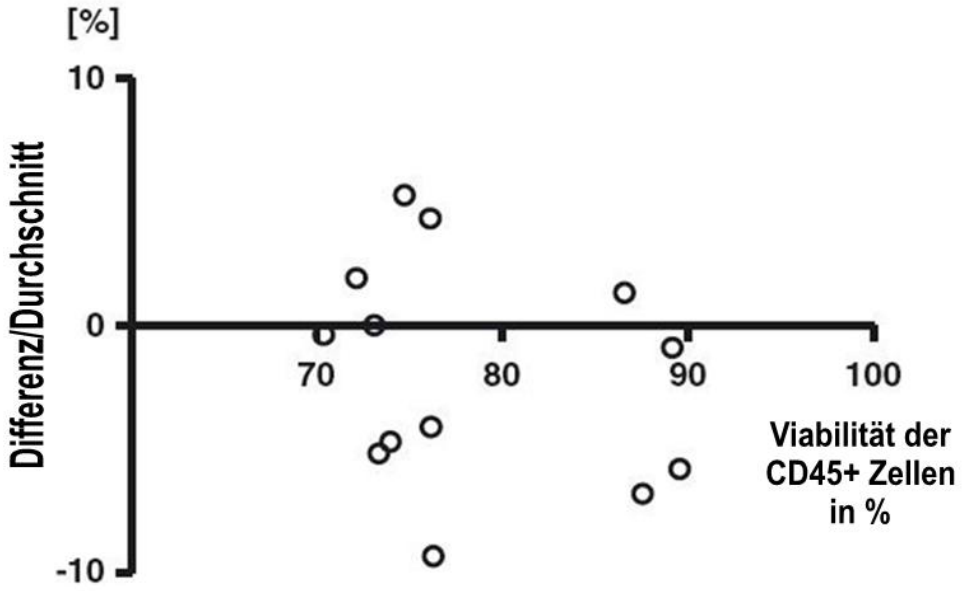

Abbildung 7: Viabilität der CD45+ Ereignisse in kryokonservierten und aufgetauten Proben. Diese Graphik stellt die Bland-Altman-Analyse für die Viabilität gemessen an den beiden Durchflusszytometern dar. (Gutensohn, K, Nikolitsis, A et al., 2012)
Gestrichelte Linie: 95% CI; durchgehende Linie: Regressionsgerade.

3.4 Kosten

Um den ökonomischen Aspekt zu berücksichtigen, wurde der Preis für eine Einzelmessung ermittelt. Da der Accuri C6 seine Messungen volumetrisch durchführt, werden keine Beads benötigt. Dies wiederum erlaubt dem Anwender auf das Reagenzien–Kit zu verzichten und die Reagenzien einzeln zu erwerben.

Die monoklonalen Antikörper für den Accuri C6 stammen von der Firma DIANOVA GmbH (Hamburg, Deutschland). Das Stem-Kit für den Epics XL stammt von der Firma Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland). Da das System des Accuri C6 auf entionisiertes Wasser als Hüllflüssigkeit optimiert wurde, können somit die laufenden Kosten weiter reduziert werden. Bei der Verwendung des Epics XL entstehen zusätzliche Kosten durch den Flow-Check, der einmal täglich, und durch das FlowSet, welches einmal wöchentlich auf dem Epics XL durchgeführt werden sollten.

Tabelle 5: Kostenkalkulation einer Einzelmessung für den Accuri C6

Accuri C6			
Reagenz	**Listenpreis**	**Testgröße**	**Preis pro Analyse**
CD45 FITC / IgG1 PE	595,00 €	100	5,95 €
CD45 FITC / CD34 PE	447,00 €	100	4,47 €
ADG-Lyse	388,00 €	1.000	0,39 €
7-AAD	134,00 €	400	0,34 €
Summe:			**11,14 €**

Tabelle 6: Epics XL, Kostenkalkulation für eine Einzelmessung

Epics XL			
Reagenz	**Listenpreis**	**Testgröße**	**Preis pro Analyse**
Stem-Kit Reagenz	1.314,00 €	50	26,28 €
Summe:			**26,28 €**

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eine gute Vergleichbarkeit der Messwerte aus den Analysen der CD34+ und CD45+ Zellen in den peripheren Blutstammzellproben mit geringen Konzentrationen an Zielzellen, genauso wie in den Apheresatprodukten mit hohen Konzentrationen an Zielzellen und in den behandelten Zellprodukten wie den kryokonservierten und aufgetauten Zellprodukten. Eine Ausnahme bilden die Vitalitäts-messungen der CD45+ Zellen in den aufgetauten Apheresatproben. Ein Grund für diese Ungenauigkeit könnte in der kleinen Probenanzahl liegen, denn der p-Wert, der in einem zweiarmigen Design überprüft worden ist, zeigte bereits einen Trend in diese Richtung mit $p = 0{,}097$. Die kleine Probenanzahl ließ sich aufgrund des kurzen Zeitrahmens, in dem das Gerät für die Untersuchung zur Verfügung stand, nicht vergrößern. Wegen der hier aufgezeigten Limitierung dieser Studie sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um unsere Ergebnisse zu bestätigen.

4. Diskussion

Die Zahl der autologen und allogenen Stammzelltransplantationen ist über die Jahre kontinuierlich gestiegen (Copelan, 2006; Lungman et al., 2006). Da die Qualität eines Stammzelltransplantats von der Zahl der lebensfähigen CD34+ Stamm– und Progenitorzellen abhängt, ist die genaue Bestimmung dieser Zellen unerlässlich (Baech et al., 2000; Gratama et al., 2001; Allen et al., 2002). Dies erfordert eine qualitätsgesicherte laboranalytische Überprüfung der Transplantate. Hierfür stellt die Single-Platform-Methode heutzutage ein modernes und zuverlässiges Verfahren zur CD34+ Zellzählung dar (Keeney et al., 1998; Chang et al., 2004; Sutherland et al., 2009; Dauber et al., 2011). Das primäre Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Vergleichbarkeit der Messergebnisse eines neuen Durchflusszytometers, mit dem Potenzial zur direkten volumetrischen Messung von CD34+ Stamm– und Progenitorzellen, mit denen einer bewährten durchflusszytometrischen Single-Platform-Methode.

Im Folgenden werden zuerst die jeweiligen Verfahren der Dual- und Single-Platform-Methoden diskutiert. Anschließend werden die Messergebnisse der Bead-basierten denen der volumetrischen Methode, die für diese Studie erhoben worden sind, gegenübergestellt, verglichen und in den Kontext der alltäglichen Praxis gestellt.

Die Single-Platform-Methode, bei der nur ein Messgerät verwendet wird, entwickelte sich auf der Basis der Dual-Platform-Methode. Während mit der Dual-Platform-Methode der Prozentsatz einer Teilmenge von Zellen berechnet wird (Keeney et al., 1998; Gratama et al., 2001; Ngoma et al., 2011), kann mit der Single-Platform-Methode die absolute CD34+ Zellzahl ermittelt werden (Keeney et al., 1998). Die Single-Platform-Methode hat sich gegenüber der Dual-Platform-Methode aufgrund ihrer guten Vergleichbarkeit zwischen den Laboratorien bewährt (Gratama et al., 2001) und wird unter anderem aus diesem Grund empfohlen (Moretti et al., 2002). Zudem ist die Dual-Platform-Methode durch die Leistungsfähigkeit des hämatologischen Analysators begrenzt (Brando et al., 2000). Durch den hämatologischen Analysator kann es bei Anwesenheit von kernhaltigen roten Blutzellen zu einer falsch hohen Leukozytenzählung kommen (Barnett et al., 1999; Gratama et al., 2001). Auch Proben mit geringen Leukozytenzahlen zeigen unterschiedliche Ergebnisse (Brando et al., 2000). Ein anderer Nachteil besteht darin, dass die Konfiguration des Durchflusszytometers und des hämatologischen Analysators für die zu bestimmende Population an Zellen exakt korrelieren muss, da es sonst zu Fehlern kommen kann (Brando et al., 2000). Darüber hinaus beinhaltet die Dual-Platform-Methode generell ein Lyse-Wash-

Verfahren, was zum Verlust von Leukozyten führen kann (Keeney et al., 1998). Das Single-Platform-Verfahren hingegen ist schnell, einfach, akkurat (Keeney et al., 1998) und besitzt gegenüber der Dual-Platform-Methode eine geringere Möglichkeit für abweichende Ergebnisse (Brando et al., 2000).

Insgesamt zeichnet sich das Single-Platform-Verfahren durch eine gute Reproduzierbarkeit aus (Keeney et al., 1998). Es gilt daher seit Jahren als das zuverlässigste Verfahren für die Messung von CD34+ Zellen (Sutherland et al., 2009; Chang et al., 2004) und für einen Vergleich der Messergebnisse zwischen diversen Laboratorien (Gratam et al., 1999). Die Resultate einer internationalen Multicenter-Studie zeigten beim Einsatz der Single-Platform-Methode einen coefficient of variation (CV) von unter 9% zwischen den beteiligten Laboratorien (Gratama et al., 2003).

Die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Single-Platform-Methode wird jedoch auch von einigen Faktoren beeinflusst, wobei das „Reverse-Pipettieren“ einen der wichtigsten darstellt (Serke et Johnsen, 2001). Da es beim konventionellen Pipettieren zum Einschluss von Luftbläschen kommen kann, wird der Einsatz eines „Reversen Pipettierens“ empfohlen, wie es auch in dieser Studie durchgeführt wurde.

Es kann bei der Single-Platform-Methode zwischen einem volumetrischem oder einem Bead-basiertem Verfahren unterschieden werden (Gratama, 2001). Die Bead-basierte Technologie wurde 1982 konzipiert (Stewart et Steinkamp, 1982), während die volumetrische Methode bereits 1969 entwickelt wurde (Dittrich et Göhde, 1969).

Die Bead-basierte Single-Platform-Methode hat sich zur Zeit als „Goldstandard“ durchgesetzt (Keeney und Sutherland, 2000). Die direkte volumetrische Durchflusszytometrie wurde schon früher angewandt, jedoch war aufwändiges Kalibrieren mit Mikropartikeln notwendig, um Operator-unabhängige Genauigkeit und Stabilität der Kalibration über einen längeren Zeitraum zu ermöglichen (Connelly et al., 1995).

Die Bead-basierte Methode kann neben der eigentlichen durchflusszytometrischen Funktion auch Teil einer umfassenden Qualitätskontrolle im Labor für CD4-Zellzählung sein. Lawrie et al. zeigten am EpicsXL-MCL für die CD4-Zellzählung, dass fehlerhafte Werte der Bead-Count-Rate durch erneute Messung zeitnah revidiert werden konnten ohne die Laborroutine zu unterbrechen (Lawrie et al., 2010). Des Weiteren bestätigen Studien die Genauigkeit der CD34+ Zellzählung durch diese auf fluoreszierende Mikropartikel basierte Single-Platform-Methode (Schlenke et al., 1999). Einige Sachverhalte können jedoch die Genauigkeit der Bead-basierten Zählung beeinflussen. Zu diesen gehören unter anderem, dass Beads dazu neigen entweder auf dem

Boden zu sedimentieren oder zur Oberfläche auf zu steigen. Darüber hinaus kann es zu einer möglichen Überlappung der Fluoreszenzsignale kommen. Deshalb ist eine sorgfältige Mischung und Dispersion der Beads und der Zellproben erforderlich sowie die Vermeidung von Bläschen- oder Schaumbildung (Brando et al., 2000). Aufgrund der Verdünnung der Proben, wie zum Beispiel in den Aphereseprodukten, kann die Proteinkonzentration reduziert sein, was wiederum dazu führt, dass die Beads verklumpen und es infolgedessen zu falschen Messungen kommt (Brando et al., 2001).

Deshalb kann der Einsatz einer direkten volumetrischen Bestimmung der CD34+ Ereignisse viele dieser Einflussfaktoren umgehen und von Vorteil sein. Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Studie das Durchflusszytometer Accuri C6 eingesetzt (Accuri Cytometers, Ann Arbor, MI, USA [2011 aufgekauft durch Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA]). Es ermöglicht eine direkte volumetrische Messung, ohne dabei auf Beads angewiesen zu sein. Hierdurch ist eine direkte Messung der Zellkonzentration möglich. Bei dieser Technik sind die Bead-assoziierten Störfaktoren der Messungen somit ausgeschlossen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eine gute Korrelation für CD34+ und CD45+ Zellzählungen. Sie zeigen sowohl in den Monitoring-Proben, mit niedrigen Konzentrationen der Zielzellen, und Apherese-Proben, mit hohen Konzentrationen dieser Zellen, als auch in den aufgetauten kryokonservierten Proben eine gute Vergleichbarkeit.

Heutzutage ist die Zählung der CD4 T-Zellen für die Antiretrovirale Therapie (ART) kostengünstig möglich, indem volumetrische Single-Platform Durchflusszytometer ohne teure Beads Verwendung finden. So wiesen unter anderem zwei Studien nach, dass das volumetrische Auto40 Durchflusszytometer (Apogee Flow Systems Ltd., Hemel Hempstead, Großbritannien) im Vergleich mit dem FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) verwendbare Ergebnisse liefert. Die volumetrischen Durchflusszytometer sind insbesondere in Entwicklungsländern von Bedeutung, da sie neben der Kosteneinsparung einfach zu transportieren sind. Die Durchflusszytometer Auto40 und CyFlow SL_3 können beispielsweise mit einer 12-Volt-Autobatterie genutzt werden und somit auch an schwierig zugänglichen Orten, die nicht über die nötigen Resourcen verfügen, betrieben werden (Mbopi-Keou et al., 2012b). Dies wurde beim mobilen Einsatz des Auto40 mit einer guten Korrelation zu den Referenzwerten bestätigt (Mbopi-Keou et al., 2012a). Möglicherweise findet die Technik daher auch ihren Einsatz bei der Bestimmung von CD34+ Zellen.

In der Gegenüberstellung der beiden Single-Platform-Methoden – dem Bead-basierten und dem volumetrischen Verfahren – zeigte sich in dieser Studie, dass eine direkte vo-

lumetrische Zählung von CD34+ und CD45+ Zellen in verschiedenen Proben möglich ist, da sie eine gute Korrelation zur Bead-basierten Methode, dem derzeitigen „Goldstandard“ der CD34+ und CD45+ Zellzählung, aufweist.

In mehreren Studien zeigte sich eine gute Vergleichbarkeit zwischen der volumetrischen und der Bead-basierten Single-Platform-Methode (Cassens et al., 2004; Fryland et al., 2006; Mortazavi, 2012). In einer Vergleichsstudie, durchgeführt in einem Entwicklungsland, zeigte sich eine gute Korrelation zwischen dem volumetrisch messenden Cyflow SL blue (Partec GmbH, Münster, Deutschland) und den Bead-basierten FACScan und FACSCount (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA) (Dieye et al., 2005). Eine weitere Studie hatte andere Ergebnisse für CD34+ Zellzählung ergeben, jedoch war der dort verwendete Ortho CytotronAbsolute Durchflusszytometer (Ortho Diagnostic Systems, Amersham, UK) für diese Aufgabe nicht geeignet, da nur ein zu geringes Volumen der einzelne Proben verwendet und analysiert werden konnte (Gratama et al., 1999). Technische Unterschiede zwischen verschiedenen Durchflusszytometern tragen zu einem großen Teil zu den Unterschieden der Messergebnisse zwischen den Laboratorien bei (Parker et al., 1990; Chance et al., 1995; Levering et al., 2007), was auch im Vergleich von Studien beachtet werden sollte. In einer weiteren Studie zeigte sich die volumetrische Messung ökonomischer und zeitsparender (Mbopi-Keou et al., 2012b).

In der Gegenüberstellung der Durchflusszytometer Epics XL und Accuri C6 zeigten einzig die Vitalität von CD45+ Zellen in aufgetauten Proben und die Reproduzierbarkeit Abweichungen zwischen den Geräten. So war die mit dem Accuri C6 gemessene Vitalität im Vergleich zum Epics XL signifikant erniedrigt. Eine Erklärung hierfür könnte die erhöhte Viskosität kryokonservierter Proben im Vergleich zu Apheresaten sein. Somit würde dies zu Messfehlern führen. Ferner wurde die Reproduzierbarkeit der Messungen getestet. Die Reproduzierbarkeit ist ein Verfahren, in dem dieselbe Probe mehrmals gemessen wird, mit dem Ziel wiederholt ein identisches Ergebnis zu erhalten. Der Epics XL lieferte unter diesem Aspekt gute Werte. Der Accuri C6 hingegen zeigte sehr unterschiedliche Resultate. Der Grund für die nicht verwertbare Reproduzierbarkeitsmessung mit dem Accuri C6 liegt daran, dass die Messung des Accuri C6 sowohl von der Viskosität der Probe als auch von dem Level der Flüssigkeit in einem Röhrchen abhängig ist. Wird die gleiche Probe beispielsweise viermal gemessen, verliert diese jedes Mal ein bestimmtes Volumen, weshalb der Flüssigkeitslevel sinkt, was somit zu Fehlmessungen führt, da von dem falschen Flüssigkeitsstand ausgegangen wird.

Ein anderer Nachteil des Accuri C6 ist die Tatsache, dass bei jedem Wechsel einer Monitoring- oder Apheresatprobe auf eine kryokonservierte Probe oder umgekehrt eine Kalibrierung notwendig wird. Hierbei muss ein Firmware Update durchgeführt werden. Dabei wird mit Hilfe des Softwareprogramms CFlow Plus ein Firmware Update und die Kalibrierung der Flüssigkeit durchgeführt, was insgesamt etwa 10 Minuten Zeit beansprucht. Diese Prozedur ist notwendig, da die Flüssigkeits-Matrix des Accuri C6 nur auf eine Viskosität eingestellt ist.

Sowohl die Anschaffungskosten als auch die laufenden Kosten zeigten einen ökonomischen Vorteil für den Accuri C6. Da für den Epics XL das Stem-Kit vorgesehen ist, lässt dies wenig Spielraum für eine Kosteneinsparung. Im Gegensatz dazu können die Reagenzien für den Accuri C6 einzeln erworben werden. Dies ermöglicht eine Kostenreduzierung um mehr als 50 Prozent (siehe Tabellen 5 und 6).

Die Interpretation der Ergebnisse dieser Studie erfolgte unter Vorbehalt, da im relativ kurzen Studienzeitraum, in der die beiden Durchflusszytometer zur Evaluierung installiert worden waren, nur ein kleiner Stichprobenumfang untersucht werden konnte. Da dies als Einschränkung der Studie betrachtet werden kann, sollten weitere Untersuchungen die vorliegenden Ergebnisse bestätigen.

Aus Gründen der günstigen Ökonomie und der geringeren Fehleranfälligkeit könnten sich auf die volumetrische Methode basierende Durchflusszytometer als Alternative zum bisherigen Bead-basierten Goldstandard etablieren.

5. Zusammenfassung

Um ein Engraftment nach einer Stammzelltransplantation zu gewährleisten, ist eine genaue CD34+ Zellzählung von hoher Priorität. Dabei muss das Monitoring eine zuverlässige Vorhersage für die zu erzielende CD34+ Zellmenge im Apheresat ermöglichen. Des Weiteren ist die genaue Überprüfung der Qualität des Apheresats und des Produktes nach Kryokonservierung für den klinischen Verlauf der Transplantation essentiell. In dieser Studie wurde die Bead-basierte Single-Platform-Methode für die CD34+ Zellanalyse mit einer Methode, welche eine direkte volumetrische Messung ermöglicht, verglichen.

Die Studie beinhaltete 14 Proben aus peripherem Blut, neun Proben von Apheresaten, und zehn kryokonservierte und anschließend aufgetaute Proben. Die Proben wurden auf CD34+ und CD45+ Zellen analysiert. In den kryokonservierten Proben wurde zusätzlich die 7-AAD-Viabilität der CD45+ Ereignisse untersucht.

Die Korrelation für die CD34+ Analysen der peripheren Blutstammzell-Proben betrugen R^2 = 0,96 (p=0,26), für die Apheresate R^2 = 0,99 (p=0,34), und für die kryokonservierten Proben R^2 = 0,96 (p=0,22). Für die CD45+ Ereignisse in den Monitoringproben zeigte sich eine Korrelation von R^2 = 0,96 (p=0,46), für CD45+ Ereignisse in den Apheresatproben R^2 = 0,83 (p=0,22), und in den kryokonservierten Proben R^2 = 0,62 (p=0.,46).

Die Ergebnisse dieser Studie, die auch 2012 im Transfusion Medicine veröffentlicht worden sind (Gutensohn et al, 2012), bestätigen die technischen Möglichkeiten der direkten volumetrischen Analyse von CD34+ und CD45+ Zellen unter einfachen und ökonomisch vorteilhaften Bedingungen.

Die direkte volumetrische Messung stellt somit eine realistische Alternative zum bisherigen Bead-basierten Goldstandard dar.

6. Abkürzungsverzeichnis

(rh)G-CSF	*(recombinant human) granulocyte colony stimulating factor*
°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
7-AAD	7-Amino-Actinomycin
ART	Antiretrovirale Therapie
CD	*Cluster of differentiation*
CFU	*Colony-Forming-Units*
CFU-GM	*Colony-Forming-Units–Granulocyte/Macrophage*
CV	*Coefficient of variation*
EDTA	Ethylen-Diamino-Tetraacetat
FC-Rezeptor	*Fragment crystallisable* Rezeptor
F/P-Ratio	FITC/PE –Konjugat Ratio
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	*Forward Scatter* (Vorwärtsstreulicht)
HLA	*Human leukocyte antigen*
HPC	*Hematopoietic progenitor cells*
ISHAGE	*International Society of Hematotherapy and Graft Engineering*
IU	*International unit*
kDa	Kilodalton
kg KG	Körpergewicht (KG) des Patienten in Kilogramm (kg)

KMT	Knochenmarkstransplantation
L	Liter
Laser	*Light amplification by stimulated emission of radiation*
mAB	*Monoclonal antibody*
mL	Milliliter
nm	Nanometer
NH_4Cl	Ammoniumchlorid
NK-cells	*Natural killer cells*
p	P-Wert, Signifikanzwert
PBPC	*Peripheral blood progenitor cells*
PBSC	*Peripheral blood stem cells*
PBST	*Peripheral blood stem cell transplant*
PE-Konjugate	Phycoerythrin-Konjugate
R	*Odds Ratio*
SSC	*Sideward scatter* (Seitwinkelstreulicht)
u.a.	Unter anderem
z.B.	Zum Beispiel

7. Literaturverzeichnis

Accuri.com (2010) Accuri Cytometers Revolutionize Flow Cytometry. [Online am 01.12.2012] http://accuricytometers.com/files/Accuri_Revolutionizes_Flow_Cytometry.pdf.

Allen D, Keeney M, Howson-Yan K, Popma J, Weir K, Bhatia M, Sutherland D, Chin-Yee I (2002) Number of viable CD34+ cells reinfused predicts engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 29(12):967-72.

Arseniev L, Pickerd N, Goudeva L, Hertenstein B, Ganser A (1999) Comparative evaluation of commonly used clones and fluorochrome conjugates of monoclonal antibodies for CD34 antigen detection. J Hematother Stem Cell Res. 8(5):547-59.

Baech J, Johnsen H (2000) Technical aspects and clinical impact of hematopoietic progenitor subset qualification. Stem Cells. 18(2):76-86.

Barnett D, Janossy G, Lubenko A, Matutes E, Neuland A, Reilly JT (1999) Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34+ haematopoietic stem cells. Clin Lab Haem. 21(5):301-8.

Barnett D, Granger V, Kraan J, Whitby L, Reilly J, Papa S, Gratama JW (2000) Reduction of intra- and interlaboratory variation in CD34+ stem cell enumeration using stable test material, standard protocols and targeted training. Br J Haematol. 108(4):784-92.

Bland JM, Altman DG (1986) Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet. 1(8476):307-10.

Brando B, Barnett D, Janossy G, Mandy F, Autran B, Rothe G, Scarpati B, D'Avanzo G, D'Hautcourt JL, Lenkei R, Schmitz G, Kunkl A, Chianese R, Papa S, Gratama JW (2000) Cytofluorometric Methods for Assessing Absolute Numbers of Cell Subsets in Blood. Cytometry, Part B. 42(6):327-46.

Brando B, Göhde W Jr, Scarpati B, D'Avanzo G, European Working Group on Clinical Cell Analysis (2001) The "vanishing counting bead" phenomenon: effect on absolute CD34+ cell counting in phosphate-buffered saline-diluted leukapheresis products. *Cytometry,* Clinical Cytometry. 43(2):154-60

Cassens U, Göhde W, Kuling G, Gröning A, Schlenke P, Lehman LG, Traoré Y, Servais J, Henin Y, Reichelt D, Greve B (2004) Simplified volumetric flow cytometry allows feasible and accurate determination of CD4 T lymphocytes in immunodeficient patients worldwide. Antivir Ther. 9(3):395-405.

Chance JT, Larsen SA, Pope V, Measel JW, Cox DL (1995) Instrument-dependent flurochrome sensitivity in flow cytometric analyses. Cytometry, Communications in Clinical Cytometry. 22(3):232-42.

Chang A, Raik E, Marsden K, Ma DD (2004) Australasian CD34+ quality assurance program and rationale for the clinical utility of the single-platform method for CD34+ cell enumeration. Cytotherapy. 6(1):50-61.

Cho SH, Godin JM, Chen CH, Qiao W, Lee H, Lo YH (2010) Review Article: Recent advancements in optofluidic flow cytometer. Biomicrofluidics. 4(4): 1932-1058.

Cilley J, Rihn C, Monreal J, gordon LI, Singhal S, Tallman M, williams S, Winter J, Mehta J (2004) Ideal or actual body weight to calculate CD34+ cell doses for

allogeneic hematopoietic stem cell transplantation? Bone Marrow Transplant. 33(2):161-4.

Civin CI, Strauss 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 KG1a cells. J Immunol. 133(1):157-65.

Connelly MC, Knight M, Giorgi JV, Lagan J, Landay Al, Parker JW, Page E, Spino C, Wilkening C, Mercolino TJ (1995) Standardization of absolute CD4+ lymphocyte counts across laboratories: an evaluation of the Ortho CytoronAbsolute flow cytometry system on normal donors. Cytometry, Communications in Clinical Cytometry. 22(3):200-10.

Copelan EA (2006) Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. N Engl J Med. 354(17):1813-26.

Coulter WH (1953) Means for counting particles suspended in a fluid. US Patent #2,656,508. In: United States Patent Office. Patentiert am 20.10.1953.

Dalchau R, Kirkley J, Fabre JW (1980) Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common antigen of the rat. Eur J Immunol. 10(10):737-44.

D´Arena G, Cascavilla N, Musto P, Greco M, Di Mauro L, Carella AM, Dello Iacono N, Carotenuto M (1996) Flow Cytometric characterization of CD34+ hematopoietic progenitor cells in mobilized peripheral blood and bone marrow of cancer patients. Haematologica. 81(3):216-23.

Dauber K, Becker D, Odendahl M, Seifried E, Bonig H, Tonn T (2011) Enumeration of viable CD34+ cells by flow cytometry in blood, bone marrow and cord blood: results of a study of the novel BD™ stem cell enumeration kit. Cytotherapy. 13(4):449-58.

De Rosa SC, Mitra DK, Watanabe N, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Roederer M (2001) Vdelta1 and Vdelta2 gammadelta T cells express distinct surface markers and might be developmentally distinct lineages. J Leukoc Biol. 70(4):518-26.

Devetten M, Armitage JO (2007) Hematopoietic cell transplantation: progress and obstacles. Ann Oncol. 18(9):1450-6.

Dieye TN, Vereecken C, Diallo AA, Ondoa P, Diaw PA, Camara M, Karam F, Mboup S, Kestens L (2005) Absolute CD4 T-cell counting in resource-poor settings: direct volumetric measurements versus bead-based clinical flow cytometry instruments. J Acquir Immune Defic Syndr. 39(1):32-7.

Dittrich W, Göhde W (1969) Impulse fluorometry of single cells in suspension. Z Naturforsch B. 24(3):360-1.

Fietz T, Reufi B, Mucke C, Thiel E, Knauf WU **(2002)** Flow cytometric CD34+ determination in stem cell transplantation: before or after cryopreservation of grafts? J Hematother Stem Cell Res. 11(2):429-35.

Fritsch G (2012) Die Quantifizierung hämatopoetischer Stammzellen mittels Durchfluss-Zytometrie und die Bedeutung der Vitalitätsmessung: schad nix/nutzt nix? Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, 45. Jahreskongress, 11.-14.11.2012.

Fryland M, Chaillet P, Zachariah R, Barnaba A, Bonte L, Andereassen R, Charrondière S, Teck R, Didakus O (2006) The Partec CyFlow Counter could provide

an option for CD4+ T-cell monitoring in the context of scaling-up antiretroviral treatment at the district level in Malawi. Trans R Soc Trop Med Hyg. 100(10):980-5.

Fulwyler MJ (1965) Electronic separation of biological cells by volume. Science. 150(3698):910-1.

Furness SG, McNagny K (2006) Beyond mere markers: Functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis. Immunologic Research. 34(1):13-32.

Gianni AM, Siena S, Bregni M, Tarella C, Stern AC, Pileri A, Bonadonna G (1989) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haemopoietic stem cells for autotransplantation. Lancet. 2(8663):580-5.

Giaretti W (1997) Origins of… flow cytometry and applications in oncology. J Clin Pathol. 50(4):275-7.

Gisselo CG, Roer O, Hoffmann M, Hansen M, Taaning E, Johnson H (2002) Assessing agreement between CD34 enumeration by flow cytometry and volumetric analysis. Bone Marrow Transplant. 9(8):699-703.

Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, Cooper S, English D, Kurtzberg J, Bard J, Boyse EA (1989) Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med. 321(17):1174-8.

Goldman JM (1994) A special report: bone marrow transplants using volunteer donors--recommendations and requirements for a standardized practice throughout the world--1994 update. The WMDA Executive Committee. Blood. 84(9):2833-9.

Gratama JW, Braakman E, Kraan J, Lankheet P, Levering WH, Van Den Beemd MW, Van Der Schoot CE, Wijermans P, Preijers F (1999) Comparison of single and dual-platform assay formats for CD34+ hematopoietic progenitor cell enumaration. Clin Lab Haematol. 21(5):337-46.

Gratama JW, Menéndez P, Kraan J, Orfao A (2000) Loss of CD34+ hematopoietic progenitor cells due to washing can be reduced by the use of fixative-free erythrocyte lysing reagens. J Immunol Methods. 239(1-2):13-23.

Gratama JW, Sutherland DR, Keeney M, Papa S (2001) Flow cytometric enumeration and immunophenotyping of hematopoietic stem and progenitor cells. J Biol Regul Homeost Agents. 15(1):14-22.

Gratama JW, Kraan J, Keeney M, Sutherland DR, Granger V, Barnett D (2003) Validation of single-platform ISHAGE method for CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cell enumeration in an international multicenter study. Cytotherapy. 5(1):55-65.

Gutensohn K, Serke S (1996) Durchflußzytometrische Analyse CD34-exprimierender hämatopoetischer Zellen in Blut und Zytaphereseprodukten. Infusionsther Transfusionsmed. 23 Suppl 2:1-23.

Gutensohn K, Magens M, Kühnl P (2000) Flow Cytometry: the standard for monitoring the onset of apheresis and for the evaluation of stem and progenitor cell graft quality. Vox Sanguinis. 78 Suppl 2:131-5.

Gutensohn K, Nikolitsis A, Gramatzki M, Humpe A (2012) Direct volumetric flow cytometric quantitation of CD34+ stem and progenitor cells. Transfus Med. 22(3):205-10.

Herzenberg LA, Sweet RG, Herzenberg LA (1976) Fluorescence-activated cell

sorting. Scientific American. 234(3):108-117.

Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA (2002) The history and future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and flow cytometry: A view from Stanford. Clinical Chemistry. 48(10):1819-1827.

Herzenberg LA, Tung J, Moore WA, Herzenberg LA, Parks DR (2006) Interpreting flow cytometry data: A guide for the perplexed. Nat Immunol. 7(7):681-5.

Humpe A, Beck C, Schoch R, Kneba M, Horst HA (2005) Establishment and optimization of a flow cytometric method for evaluation of viability of CD34+ cells after cryopreservation and comparison with trypan blue exclusion staining. Transfusion. 45(7):1208-13.

Hunt CJ, Armitage S, Peggy DE (2003) Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34+ cell to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing. Cryobiology. 46(1):76-87.

Jahan-Tigh R, Ryan C, Obermoser G, Schwarzenberger K (2012) Flow Cytometry. J Invest Dermatol. 132(10):e1.

Johnsen, HE (1995) Report from a Nordic Workshop on CD34+ cell Analysis: technical recommendations for progenitor cell enumeration in leukapheresis from multiple myeloma patients. J Hematother. 4(1):21-8.

Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR (1998) Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. Cytometry, Communications in Clinical Cytometry. 34(2):61-70.

Keeney M, Barnett D, Gratama JW (2004a) Impact of standardization on clinical cell analysis by flow cytometry. J Biol Regul Homeost Agents. 18(3-4):305-12.

Keeney M, Gratama J, Sutherland DR (2004b) Critical Role of Flow Cytometry in Evaluating Peripheral Blood Hematopoietic Stem Cell Grafts. Cytometry, Part A. 58(1):72-5.

Körbling M, Dörken B, Ho AD, Pezzutto A, Hunstein W, Fliedner TM (1986) Autologous Transplantation of Blood-Derived Hemopoietic Stem Cells After Myeloablative Therapy in a Patient With Burkitt's Lymphoma. Blood. 67(2):529-32.

Lamb L (2002) Hematopoetic cellular therapy: implications for the flow cytometry laboratory. Hematol Oncol Clin North Am. 16(2):455-76.

Lawrie D, Coetzee LM, Glencross DK (2010) A model for continuous quality control incorporating sample-to-sample assessment of optical alignment, fluorescence sensitivity, and volumetric operation of flow cytometers. Cytometry Part B; 78B: 201–210.

Levering WH, Preijers FW, van Wieringen WN, Kraan J, van Beers WA, Sintnicolaas K, van Rhenen DJ, Gratama JW (2007) Flow cytometric CD34+ stem cell enumeration: lessons from nine years external quality assessment within the Benelux countries. Cytometry Part B (Clinical Cytometry). 72(3):178-88.

Ljungman P, Bregni M, Brune M, Cornelissen J, de Witte T, Dini G, Einsele H, Gaspar HB, Gratwohl A, Passweg J, Peters C, Rocha V, Saccardi R, Schouten H, Sureda A, Tichelli A, Velardi A, Niederwieser D; European Group for Blood and Marrow Transplantation (2010) Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumors and immune disorders: current practice in Europe 2009. Bone Marrow Transplant. 2010 Feb;45(2):219-34.

Ljungman P, Urbano-Ispizua A, Cavazzana-Calvo M, Demirer T, Dini G, Einsele H, Gratwohl A, Madrigal A, Niederwieser D, Passweg J, Rocha V, Saccardi R, Schouten H, Schmitz N, Socie G, Sureda A, Apperley J; European Group for Blood and Marrow. (2006) Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumors and immune disorders: definition and current practice in Europe. Bone Marrow Transplant. 37(5):439-49.

Lovelock JE (1953) The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. Biochim Biophys Acta. 10(3):414-26.

Lysak D, Kalina T, Martínek J, Pikalová Z, Vokurková D, Jarešová M, Marinov I, Ondrejková A, Spaček M, Stehlíková O. (2010) Interlaboratory variability of CD34+ stem cell enumeration. A pilot study to national external quality assessment within the Czech Republic. Int J Lab Hematol. 32(6 Pt 1):e229-36.

Macey MG (2003) Clinical quantitative flow cytometry. Biomedical Scientist. 1286-1289.

Macey MG (2007) Flow Cytometry: Principles and Applications. Humana Press, Totowa, NJ. S. 304 ff.

Mbopi-Kéou FX, Sagnia B, Ngogang J, Angwafo FF 3rd, Colizzi V, Montagnier L, Bélec L (2012a) Validation of a single-platform, volumetric, flow cytometry for CD4 T cell count monitoring in therapeutic mobile unit. J Transl Med. 10(22): Published online 2012 February 6. doi: 10.1186/1479-5876-10-22

Mbopi-Kéou FX, Mion S, Sagnia B, Bélec L (2012b) Validation of a single-platform, volumetric, CD45-assisted PanLeucogating Auto40 flow cytometer to determine the absolute number and percentages of CD4 T cells in resource-constrained settings using Cameroonian patients' samples. Clin Vaccine Immunol. 19(4):609-15.

Molgaard HV, Spurr NK, Greaves MF (1989) The hemopoietic stem cell antigen, CD34, is encoded by a gene located on chromosome 1. Leukemia. 3(11):773-6.

Moretti S, Dabusti M, Castagnari B, Tieghi A, Ferrari L, Campioni D, Punturieri M, Dominici M, Castoldi GL, Lanza F (2002) Comparison of single and dual platform methodologies for the estimation of CD34+ hematopoietic progenitor cells: correlation with colony assay. Int J Biol Markers. 17(4):259-67.

Mortazavi S, Ardalan FA, Nodehi SR, Karder FF, Miraliakbari N (2012) True volumetric method for flow cytometric enumeration of CD34 + stem cells and its agreement with a standard bead-based single-platform protocol. Cytotherapy. 14(5):621-9.

Ngoma A, Saito S, Ohto H, Ikeda K, Yasuda H, Kawabata K, Kanno T, Kikuta A, Mochizuki K, Nollet KE (2011) CD34+ Cell Enumeration by Flow Cytometry, A Comparison of Systems and Methodologies. Arch Pathol Lab Med. 135(7):909-14.

Nguyen DT, Diamond LW, Braylan RC (2007) *Chapter 4: FCM data analysis on heterogeneous specimens. In: Flow Cytometry in Hematopathology, A Visual Approach to Data Analysis and Interpretation. 2. Auflage.* Humana Press Inc. Totowa, NJ. S. 190. ISBN: 978-1-59745-162-8.

Parker J, Adelsberg B, Azen SP, Boone D, Fletcher MA, Gjerset GF, Hassett J, Kaplan J, Niland JC, Odom-Maryon T, et al. (1990) Leucocyte immunophenotyping by flow cytometry in a multisite study: standardization, quality control and normal values in the transfusion safety study. Clin Immunol Immunopathol. 55(2):187-220.

Ruhenstroth-Bauer G, Zang D (1960) Automatische Zählmethoden: Das Coulter'sche Partikelzählgerät. Blut. 6:446-63.

Schlenke P, Frohn C, Müller-Steinhardt M, Hammers HJ, Saballus M, Klüter H (1999) Precise CD34+ Quantification Using a Multi-Parameter Flow-Cytometric Method with Fluorescent Microparticles. Infusionsther Transfusionsmed. 26(3):172-178.

Serke S, Arseniev L, Watts M, Fritsch G, Ingles-Esteve J, Johnsen HE, Linch D, Cancelas JA, Meyer O, Kadar JG, Huhn D, Matcham J (1997) Imprecision of counting CFU-GM colonies and CD34-expressing cells. Bone Marrow Transplant. 20(1):57-61.

Serke S, Johnsen H (2001) A European reference protocol for quality assessment and clinical validation of autologous haematopoietic blood progenitor and stem cell grafts. Bone Marrow Transplant. 27(5):463-70.

Siena S, Bregni M, Brando B, Ravagnani F, Bonadonna G, Gianni AM (1989) Circulating of CD34+ hematopoietic stem cell in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood. 74(6):1905-14.

Stewart CC, Steinkamp JA (1982) Quantitation of cell concentration using the flow cytometer. Cytometry. 2(4):238-43.

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 leucocyte common antigens. J Immunol. 141(11):3910-4.

Sutherland DR, Marsh JC, Davidson J, Baker MA, Keating A, Mellors A (1992) Differential sensitivity of CD34 epitopes to cleavage by Pasteurella haemolytica glycoprotease: implications for purification of CD34-positive progenitor cells. Exp Hematol. 20(5):590-9.

Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I (1996) The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. J Hematother Stem Cell Res. (3):213-26.

Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I (1997) Re: Toward a worldwide standard for CD34+ enumeration. J Hematother Stem Cell Res. 6(2): 85-89.

Sutherland DR, Keeney M, Gratama J, Greco N, Noga S (2003) *Workshop 7, Graft Evaluation.* Arizona, USA : International Society for Cellular Therapy, 2003.

Sutherland DR, Nayyar R, Acton E, Giftakis A, Dean S, Mosiman VL (2009) Comparison of two single-platform ISHAGE-based CD34 enumeration protocols on BD FACSCalibur and FACSCanto flow cytometers. Cytotherapy. 11(5):595-605.

Theilgaard-Mönch K, Raaschou-Jensen K, Heilmann C, Andersen H, Bock J, Russel CA, Vindeløv L, Jacobsen N, Dickmeiss E (1999) A comparative study of CD34+ cells, CD34+ subsets, colony forming cells and cobblestone area forming cells in cord blood and bone marrow allografts. Eur J Haematol. 62(3):174-83.

Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW (1957) Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. N Engl J Med. 257(11):491-6.

Thomas ML (1989) The leukocyte common antigen family. Ann Rev Immunol. 7:339-69.

To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA (1997) The biology and clinical uses of stem cells. Blood. 89(7):2233-58.

Trowbridge LS (1991) CD45. A prototype for transmembrane protein tyrosine phosphatases. J Biol Chem. 266(35):23517-20.

Watts MJ (1999) Clinical relevance of CD34+ cell measurements in PBSC transplantation. Cytotherapy. 1(4):348-50.

Whcf.org. 2013. Wallace H. Coulter – Engineer, Inventor, Entrepreneur, Visionary. [Online am 29.01.2013] http://www.whcf.org/about/wallace-h-coulter.

Yang H, Acker JP, Cabuhat M, Letcher B, Larratt L, McGann LE (2005) Association of post-thaw viable CD34+ cells and CFU-GM with time of hematopoietic engraftment. Bone Marrow Transplant. 35(9):881-7.

Zähringer H (2011) Zellzerstäuber mit Lasershow, Produktübersicht: Durchflusszytometer. Laborjournal. 07:48-52.

8. Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. Kai Gutensohn herzlich für die zuverlässige Begleitung und Unterstützung dieser Arbeit sowie für die wertvollen und freundschaftlichen Ratschläge während meines Studiums und für mein weiteres Leben.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei PD Dr. Andreas Humpe bedanken.

Ein ganz spezieller Dank gilt der Medizinisch Technischen Assistentin, Frau Dagmar Spitzer des Dr. Mildred Scheel-Hauses (Kiel, Deutschland) für ihre hilfreiche und geduldige Unterstützung.

Abschließend gilt mein Dank den Mitarbeitern des Aesculabors, (Hamburg, Deutschland) insbesondere Frau Clasen und Herrn Dr. Krieger.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Nikolitsis
Vorname	Alexander
Geburtsdatum	19.07.1983
Geburtsort	Hamburg

Studium

2009-2013	Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
2007-2009	Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen mit Abschluss des Ersten Staatsexamens

Schulische Laufbahn

2004-2005	Zivildienst Kreuzkirche Wandsbek, Hamburg
2000-2003	Gymnasiale Oberstufe der GSM, Hamburg Abschluss: Deutsche Hochschulreife
1996-2000	Matthias-Claudius-Gymnasium, Hamburg
1994-1996	Gymnasium Buckhorn, Hamburg
1990-1994	Grundschule Buckhorn, Hamburg

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an anderen Hochschulen zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: ……..