

Aus der Abteilung Sektion für Stammzell- und Immuntherapie  
(Prof. Dr. M. Gramatzki)  
im Dr. Mildred-Scheel-Haus  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

---

**QUALITÄTSKONTROLLE IN DER  
TRANSPLANTATION HÄMATOPOETISCHER PROGENITORZELLEN**  
–  
**OPTIMIERUNG UND STANDARDISIERUNG DER TESTUNG  
KLONOGENEN WACHSTUMS**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**JULIA FASOLD**  
aus  
Schwerin

Kiel 2010

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Andreas Humpe

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Paul-Martin Holterhus

Tag der mündlichen  
Prüfung:

28.01.2010

Zum Druck  
genehmigt,  
Kiel, den

28.01.2010

gez.

Prof. Dr. Dr. med. Ingolf Cascorbi

Dekan: Prof. Dr. med. Stefan Schreiber

Doktorvater: PD Dr. med. Andreas Humpe

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 <u>Einleitung</u>	1
1.1 Die adulte Stammzelle	1
1.2 Bedeutung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen in der Klinik	1
1.3 Lokalisierung und Gewinnung hämatopoetischer Progenitorzellen	2
1.4 Charakterisierung und Bestimmung hämatopoetischer Progenitorzellen	3
1.5 Bedeutung der Bestimmung hämatopoetischer Progenitorzellen im Rahmen der Transplantation	3
1.6 Fragestellung der Doktorarbeit	6
2 <u>Material und Methoden</u>	7
2.1 Untersuchungsdesign	7
2.2 Ausgangsmaterial	7
2.3 Analyse CD34-positiver Zellen	10
2.4 Analyse des klonogenen Wachstums	10
2.5 Versuchsaufbau	11
2.6 Statistische Analyse	13
3 <u>Ergebnisse</u>	14
3.1. Analyse CD45-positiver Zellen und CD34-positiver Zellen	14
3.2 Ansätze der koloniebildenden Einheiten	15
3.2.1 Normierung auf vitale CD34-positive Zellen	15
3.2.2 Normierung auf vitale CD45-positive Zellen	16
3.2.3 Streuung der Klonogenitätsanalyse	21
4 <u>Diskussion</u>	24
4.1 Verfahren beim Anlegen und Auszählen von Kulturen	24
4.1.1 Waschschrirte	24
4.1.2 Verwendung von Zellart und Zellkonzentration	25

4.1.3	Zellzählung vor und nach Kryokonservierung	26
4.1.4	Verwendung eines einheitlichen Nährmediums	26
4.1.5	Anzahl der Kulturansätze	27
4.1.6	Definition der Zellkolonie	27
4.2	Konsequenzen fehlender Standardisierung	27
4.3	Standardisierung für die Qualitätskontrolle in den Zentren	28
5	<u>Zusammenfassung</u>	30
6	<u>Literaturverzeichnis</u>	32
7	<u>Anhang</u>	35
8	<u>Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen</u>	37
9	<u>Danksagung</u>	38
10	<u>Lebenslauf</u>	39

## Abkürzungen

7-AAD	= Actinoaminomycin D
AMG	= Arzneimittelgesetz
AML	= Akute myeloische Leukämie
ALL	= Akute lymphatische Leukämie
BÄK	= Bundesärztekammer
CFU-GM	= Colony-Forming Unit Granulocyte Macrophage
DGTI	= Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie
DMSO	= Dimethylsulfoxid
G-CSF	= engl. Granulocyte-Colonie Stimulating Factor (Granulozyten- Kolonie stimulierender Faktor)
GMP	= Good Manufacturing Practice
HPZ	= Hämatopoetische Progenitorzelle
HSZ	= Hämatopoetische Stammzelle
ISHAGE	= International Society of Hematotherapy and Graft Engineering
KMT	= Knochenmarkstransplantation
MDS	= Myelodysplastisches Syndrom
MPS	= Myeloproliferatives Syndrom
MM	= Multiples Myelom
NHL	= Non-Hodgkin-Lymphom
PBSZT	= Periphere Blutstammzelltransplantation

## 1. Einleitung

### 1.1 Die adulte Stammzelle

Die regenerative Therapie mit adulten Stammzellen ist ein Bereich der Medizin, dem ein hoher Stellenwert zugeschrieben wird. Im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen sind adulte Stammzellen in verschiedenen Geweben des Menschen z.B. in Knochenmark, Nabelschnurblut, Haut, Fettgewebe, Gehirn, Leber, Pankreas und Muskelgewebe, nachweisbar. Die Gewinnung kann somit, im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen, ohne ethische Konflikte durchgeführt werden.

Die nicht spezialisierten adulten Stammzellen besitzen die Kapazität, sich in spezialisierte Zellen zu differenzieren. Gleichzeitig erhalten sie einen Pool an potentiellen, proliferationsfähigen Stammzellen. Es gibt zudem Daten darüber, dass Stammzellen spezialisierte Zellen fremder Gewebe in Abhängigkeit von spezifischen Wachstumsfaktoren (z.B. Zytokinen) regenerieren können. Diese Fähigkeit wird als Plastizität bezeichnet (Domen et al. 2006).

### 1.2 Bedeutung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen in der Klinik

Im Vergleich zu adulten Stammzellen anderer Gewebe hat sich die Therapie mit hämatopoetischen Stamm- oder Progenitorzellen (HSZ oder HPZ) innerhalb der letzten 30 Jahre etabliert. Mit zunehmender Kenntnis der Zellseparation in den siebziger Jahren wurde bereits in den achtziger Jahren die Knochenmarkstransplantation (KMT) als Standardtherapie bei lebensbedrohlichen Erkrankungen des Blutsystems eingesetzt. Mitte der neunziger Jahre wurde mit der peripheren Blutstammzelltransplantation (PBSZT) ein neues Transplantationsverfahren für den klinischen Einsatz verfügbar (Ottinger und Beelen 2006).

Bei den Erkrankungen, die mit einer Transplantation von HPZ behandelt werden können, handelt es sich um maligne Erkrankungen der Hämatopoese oder des lymphatischen Systems (Leukämien und Lymphome), Störungen der Blutbildung oder des Immunsystems (aplastische Anämie und angeborene schwere kombinierte

Immundefekte), angeborene Stoffwechselerkrankungen (Enzymdefekte) sowie einige solide Tumoren (z.B. Keimzelltumoren und Weichteilsarkome).

Die Hauptindikationen für eine allogene Transplantation (Spender und Empfänger sind genetisch verschieden) sind die akuten Leukämien (akute myeloische Leukämie (AML) und akute lymphatische Leukämie (ALL)) sowie das myelodysplastische und das myeloproliferative Syndrom (MDS und MPS). Als Hauptindikationen für eine autologe Transplantation (Spender und Empfänger sind identisch) gelten das Plasmozytom (oder Multiples Myelom (MM)), das Non-Hodgkin-Lymphom (NHL), und der Morbus Hodgkin (Ottinger et al. 2006).

### 1.3 Lokalisierung und Gewinnung hämatopoetischer Progenitorzellen

HPZ können aus drei Quellen gewonnen werden: aus dem Knochenmark (durch multiple Punktionen und Aspiration), aus dem peripheren Blut (durch Leukapherese) nach Mobilisationstherapie mittels Chemotherapeutika- und/oder Zytokingabe und aus dem Plazentarestblut (postnatal durch Punktion der Nabelschnur).

Eine Besonderheit bei der Gewinnung von HPZ aus dem peripheren Blut ist die notwendige medikamentöse Vorbehandlung des Spenders oder Patienten zur Mobilisierung der Zellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut. Bei allogenen Spendern geht der Durchführung der Leukapherese eine subkutane Gabe Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktors (engl. Granulocyte-Colony Stimulating Factor, G-CSF) voraus. Bei autologen Spenden erfolgt die Mobilisierung durch Gabe von Chemotherapie und/oder Gabe von G-CSF. Durch die Vorbehandlung steigt die Anzahl der HPZ im Blut auf ein vielfaches, so dass in einer bis wenigen Sitzungen eine für die Transplantation ausreichende Anzahl von HPZ gesammelt werden kann. Die Gewinnung und Transplantation von HPZ aus dem peripheren Blut hat gegenüber der Transplantation mit aus anderen Geweben gewonnenen Progenitorzellen die Vorteile, dass zu der Sammlung keine Intubationsnarkose nötig ist und die Transplantation aufgrund der schneller verlaufenden Regeneration für den Patienten mit geringeren akuten Komplikationsraten und einer kürzeren Hospitalisierungsdauer assoziiert ist (To et al. 1997).



#### 1.4 Charakterisierung und Bestimmung hämatopoetischer Progenitorzellen

Sowohl für die Festlegung des korrekten Sammlungszeitpunktes als auch für die Beurteilung der Transplantatqualität hinsichtlich des Gehaltes an HPZ sind valide Messmethoden notwendig. HPZ sind zum einen durch die Expression bestimmter Antigene charakterisiert. Dabei kommt dem CD34 Antigen (Civin et al. 1984) herausragende Bedeutung zu. Seit der Entwicklung von Fluorochrom konjugierten Antikörpern gegen dieses Antigen ist es möglich geworden, Zellproben durchflusszytometrisch schnell und verlässlich hinsichtlich des Gehaltes an CD34-positiven Zellen zu analysieren. Dabei werden zusätzlich der Panleukozytenmarker CD45 und die Vitalität der Zellen anhand des Färbeverhaltens gegenüber 7-Actinomycin D (7-AAD) bestimmt (Keeney et al 1998).

Zum anderen sind HPZ anhand ihrer Eigenschaft der Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit messbar. In Abhängigkeit der gewählten Untersuchung und den dabei verwendeten Wachstumsfaktoren können die Zellen in die unterschiedlichen hämatopoetischen Zellreihen proliferieren und differenzieren. Im Rahmen der Charakterisierung von HPZ-Transplantaten hat die Untersuchung der koloniebildenden Einheit der Granulozyten und Makrophagen (CFU-GM, engl. Colony-Forming Unit Granulocyte Macrophage) die weiteste Verbreitung gefunden.

#### 1.5 Bedeutung der Bestimmung hämatopoetischer Progenitorzellen im Rahmen der Transplantation

Allogene HPZ Produkte werden zumeist frisch innerhalb von 72 Stunden transfundiert. In diesem Zeitraum werden die Zellen bei Temperaturen von +2 bis +6°C gelagert. Über die 72 Stunden hinaus ist eine Kryokonservierung notwendig. Hierbei werden die Präparate unter sterilen Bedingungen mit einer Gefrierschutzlösung, deren Basis Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentration von 5-12% ist, versetzt und in mehreren Portionen in speziellen Beuteln kryokonserviert. Unter denselben Bedingungen werden sogenannte Pilotröhrchen für spätere Qualitätskontrollen angelegt. Der Einfriervorgang wird unter kontrollierten Bedingungen bei vorgegebenen Kühlraten vorgenommen (Humpe et al. 2005). Die Lagerung erfolgt anschließend in der Gasphase über flüssigem Stickstoff bei

Temperaturen unter  $-140^{\circ}\text{C}$ . Nach einer Lagerung von mindestens 24 Stunden können die ersten Pilotröhrchen für Tests aufgetaut werden.

Das Auftauen des Transplantats erfolgt unmittelbar vor Transplantation in einem dafür zugelassenen Gerät bei  $+37^{\circ}\text{C}$ . Dabei wird auf Waschschriffe zum Entfernen des DMSO verzichtet, um Zellverluste zu vermeiden (Mueller-Eckhard und Kiefel 2004). Die Transplantation erfolgt zumeist nach myeloablativer Chemotherapie und/oder Ganzkörperbestrahlung. Empfehlungen zufolge ist für autologe Transplantationen eine Dosis von mindestens  $2 \times 10^6$  CD34-positiven Zellen je kg Körpergewicht und für allogene Transplantationen von mindestens  $4 \times 10^6$  CD34-positiven Zellen je kg Körpergewicht des Empfängers für ein kurz- und langfristiges Anwachsen des Transplantats notwendig (Yang et al. 2005; Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer unter Mitwirkung des Paul-Ehrlich-Institutes 1997).

Insbesondere während des Gefriervorgangs und des Auftauens kann es zu Verlusten und Schädigungen der HPZ kommen. Qualitätskontrollen der Transplantate vor und nach Kryokonservierung kommen daher eine entsprechende Bedeutung zu.

In den aktuellen Richtlinien von 1997 zur Blutstammzellgewinnung und Transplantation vom wissenschaftlichen Beirat der Bundesärztekammer (BÄK) wird der Umfang der Qualitätskontrollen nach Kryokonservierung wie folgt beschrieben: „Von jedem Stammzellapheresepreparat sind Volumen, Leukozytenzahl mit Differentialverteilung einschließlich des Anteils CD34-positiver Zellen, Viabilität mit ggf. CFU-GM, [...] zu kontrollieren. Nach weiteren Präparationsschritten sind diese Untersuchungen zu wiederholen (A1589).“ Die Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI) ergänzen die Richtlinien des wissenschaftlichen Beirats der BÄK. So geben sie z.B. Durchführungsempfehlungen für die Hämapherese.

Den rechtlichen Rahmen für die Gewinnung und Transplantation von HPZ schaffen Gesetze, wie z.B. das Gewebegesetz, das Medizinproduktegesetz (MPG), der europäische Leitfaden zur „Good Manufacturing Practice“ (GMP) und das Arzneimittelgesetz (AMG) (Matthes et al. 1998).

Bezüglich der Vorgaben für obligate Qualitätskontrollen nach Kryokonservierung sind noch keine präzisen Angaben vorhanden. Darüber hinaus ist die Bewertung der einzelnen Methoden nach Kryokonservierung nicht einheitlich. Am weitesten

verbreitet ist die Messung der Vitalität der Zellen mittels Trypan Blau Färbung und mikroskopischer Analyse bzw. die durchflusszytometrische Analyse CD45- und CD34-positiver Zellen hinsichtlich ihrer Positivität für den Vitalitätsfarbstoff 7-AAD. Einige Zentren führen nach Kryokonservierung eine Klonogenitätsanalyse der CFU-GM durch. Dies erfolgt entweder stichprobenartig oder in Abhängigkeit von Auffälligkeiten in den anderen Analysen.

Die Klonogenitätsanalyse der CFU-GM zeigt bisher große Variabilität. Differenzen zwischen den Zentren hinsichtlich der verwendeten Geräte und der Protokolle erschweren weiterhin die Vereinheitlichung und Interpretation der Tests und ihrer Ergebnisse. Fehlende Standardisierungen führen auch innerhalb eines Zentrums zu hoher Variabilität. Insbesondere die Evaluierung klonogenen Zellwachstums nach Kryokonservierung zeigt Unterschiede hinsichtlich angewandter Protokolle und Referenzparameter.

Sheikhzadeh et al. (2001) nennt verschiedene Ansätze zur Standardisierung des Klonogenitätstests:

- (1) Anstelle einer konstanten Zahl CD45-positiver Zellen soll eine feste Zahl CD34-positiver Zellen pro Kulturschale kultiviert werden. Er reagiert damit auf die Verschiebung nach Kryokonservierung innerhalb der Population CD45-positiver Zellen (durch die Kryokonservierung sterben v.a. Neutrophile ab, kaum aber CD34-positiv Zellen (Yang et al. 2005)).
- (2) Ein einheitliches getestetes Medium (Kit HCC 4434, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) sorgt für konstante Bedingungen bei dem Anlegen von Kulturen.
- (3) Festgelegte Arbeitsprotokolle sorgen für reproduzierbare Arbeitsschritte.
- (4) Einheitliche Zählkriterien und individuelles Training resultieren in einer verlässlicheren Auswertung des Koloniewachstums.

Unter Anwendung dieser Punkte erreicht er einen Variationskoeffizient von 12,3 - 15,5%, was für eine gute Reproduzierbarkeit spricht.

Ein weiterer Ansatz ist die Eliminierung von Zentrifugation und Waschschritten zur Entfernung des Frostschutzmittels und toter Zellen, die zu weiteren Zellverlusten führen. Durch alleinige Verdünnung erreicht Yang et al. (2003) nur minimal toxische DMSO-Werte (<0,1%).

## 1.6 Fragestellung der Doktorarbeit

Die vorliegende Arbeit soll aufzeigen, dass bei kryokonservierten HPZ Produkten die Standardisierung der Klonogenitätsanalyse der CFU-GM auf eine definierte Anzahl vitaler CD34-positiver Zellen der Standardisierung auf eine Zellkonzentration CD45-positiver Zellen hinsichtlich Praktikabilität und Varianz überlegen ist. Gleichzeitig soll bei der Analyse klonogenen Wachstums auf Manipulationen wie Zentrifugationen oder Waschschriffe verzichtet werden, um die Situation am Patientenbett während der Transplantation möglichst präzise zu imitieren.

Mit Hilfe dieser Standardisierungsschritte kann die Klonogenitätsanalyse der CFU-GM als verlässliches und reproduzierbares Verfahren der Qualitätskontrolle nach Kryokonservierung etabliert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Untersuchungsdesign

Von 563 autologen HPZ Spenden der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie der II. Medizinische Klinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, aus den Jahren 2003 bis 2006 waren Angaben zur Konzentration der CD34-positiven Zellen pro  $\mu\text{l}$  nach Kryokonservierung verfügbar. Diese Proben wurden anhand dieser Konzentration (30 – 28.220 CD34-positive Zellen pro  $\mu\text{l}$ ) geordnet. Um in der Arbeit Proben aus dem gesamten Konzentrationsbereich zu analysieren, wurde jede achzehnte Probe für die Versuche ausgewählt, so dass eine Gesamtzahl von 30 kryokonservierten Pilotröhrchen mit einer Konzentrationsspanne von 140 – 12.710 CD34-positiven Zellen pro  $\mu\text{l}$  in die Untersuchung eingeschlossen wurden.

### 2.2 Ausgangsmaterial (Tab. 1, S. 9)

Die untersuchten Proben stammten von 30 unterschiedlichen Patienten. Von diesen waren 20 männlich und 10 weiblich mit einem medianen Alter von 53,5 Jahren und einer Spanne von 17 bis 68 Jahren. Die Zusammensetzung der Diagnosen war wie folgt: Morbus Hodgkin (n=2), Plasmozytom (n=13), Non-Hodgkin-Lymphom (n=9), solider Tumor (n=4) und akute lymphatische Leukämie (n=2).

Dabei ist bei 28 der Patienten im Vorfeld eine Behandlung (Chemo- und/oder Radiotherapie) durchgeführt worden. Die Patienten wurden mit folgenden Mobilisierungsprotokollen behandelt:

- IEV (*Ifosfamid, Epirubicin, Etoposid*) + G-CSF (n=11),
- DHAP (*Cisplatin, ARA-C (Cytosinarabinosid), Dexamethason*) + G-CSF (n=6),
- PEI (*Cisplatin, Etoposid, Ifosfamid*) + G-CSF (n=2),
- R-DHAP (*Rituximab-DHAP*) + G-CSF (n=2),
- G-CSF (n=2),
- DEXA-BEAM (*Dexamethason, BCNU (Carmustin), Etoposid, Cytarabin, Melphalan*) + G-CSF (n=1),

- R-Dexa-BEAM (+*Rituximab*) + G-CSF (n=1),
- RICE (*Rituximab, Ifosfamid, Carboplatin, Etoposid*) + G-CSF (n=1),
- VIDE (*Vincristin, Ifosfamid, Doxorubicin, Etoposid*) + G-CSF (n=2)
- und die Konsolidierungstherapie I der ALL-Studie (*Methotrexat, Dexamethason, Vindesin, Etoposid, Cytosinarabinosid*) + G-CSF (n=2).

Tab. 1: Patientenkollektiv, Diagnose und Mobilisierungsprotokolle

Anzahl der Spender	n=30
Medianes Alter (in Jahren)	53,5
Geschlecht	m: n=20 w: n=10
Mobilisierungstherapie	ja: n=28 nein: n=2
Diagnose	M. Hodgkin (n=2) Plasmozytom (n=13) NHL (n=9) Solider Tumor (n=4) ALL (n=2)
Mobilisierungsprotokoll	G-CSF (n=2) IEV+G-CSF (n=11) Dexa-BEAM+G-CSF (n=1) R-Dexa-BEAM + G-CSF (n=1) RICE+G-CSF (n=1) PEI+G-CSF (n=2) R-DHAP+G-CSF (n=2) DHAP+G-CSF (n=6) Kons I der ALL-Studie + G-CSF (n=2) VIDE + G-CSF (n=2)

Legende: NHL = Non-Hodgkin-Lymphom; ALL = Akute lymphatische Leukämie; IEV = Ifosfamid, Epirubicin, Etoposid; DHAP = Cisplatin, ARA-C (Cytarabin), Dexamethason; PEI = Cisplatin, Etoposid, Ifosfamid; R-DHAP = Rituximab-DHAP; G-CSF = Granulocyte-Colony Stimulating Factor; Dexa-BEAM = Dexamethason, BCNU (Carmustin), Etoposid, Cytarabin, Melphalan; RICE = Rituximab, Ifosfamid, Carboplatin, Etoposid; VIDE = Vincristin, Ifosfamid, Doxorubicin, Etoposid

### 2.3 Analyse CD34-positiver Zellen

Die Messung der CD34-positiven Zellen nach Kryokonservierung erfolgte nach der von Humpe et al. (2005) publizierten modifizierten ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering)-Methode als „single platform“-Analyse (Keeney et al. 1998). Die Konzentration CD45-positiver und CD34-positiver Zellen pro  $\mu\text{l}$  und die Zellvitalität, gemessen mittels 7-AAD, wurden auf diese Weise bestimmt.

Die ermittelte Konzentration der 30 Proben reichte von 48.230 bis 232.700 CD45-positiven Zellen pro  $\mu\text{l}$  bzw. von 140 bis 12.710 CD34-positiven Zellen pro  $\mu\text{l}$  (*Abb. 2, S. 14 und Abb. 3, S. 15*). Der prozentuale Anteil der CD34-positiven an den CD45-positiven reichte von 0,09 bis 12,71%. Auf Basis dieser Werte wurden die Zellkonzentrationen und Verdünnungen für die Klonogenitätsanalyse ermittelt.

### 2.4 Analyse des klonogenen Wachstums

Für jedes Pilotröhrchen wurden auf der Basis der durchflußzytometrisch gemessenen Zellkonzentrationen die spezifischen Verdünnungen hergestellt, von denen dann vier Ansätze mit 200 vitalen CD34-positiven Zellen pro Kulturschälchen und vier Ansätze mit  $0,5 \times 10^5$  vitalen CD45-positiven Zellen pro Kulturschälchen angelegt wurden (Humpe et al, 2007). Nach 14 Tagen Inkubationszeit fand die Auszählung jedes einzelnen Schälchens unter einem Inversmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) mit Hilfe einer Rasterschale (Nunc™ A/S, Roskilde, Dänemark ) von links nach rechts statt. Kolonien mit mindestens 20 Zellen wurden gezählt.

Für die interne Qualitätskontrolle wurden sechs Ansätze ein und derselben Spende mit bekannten Konzentrationen CD45-positiver und CD34-positiver Zellen im Viereransatz angelegt und ausgezählt. Aus diesen Ansätzen wurde der Variationskoeffizient als Maß für die Reproduzierbarkeit berechnet. Zur weiteren Kontrolle fanden zusätzlich stichprobenartig Nachzählungen der Kulturschalen durch eine medizinisch technische Assistentin statt.



## 2.5 Versuchsaufbau (Abb. 1, S.12)

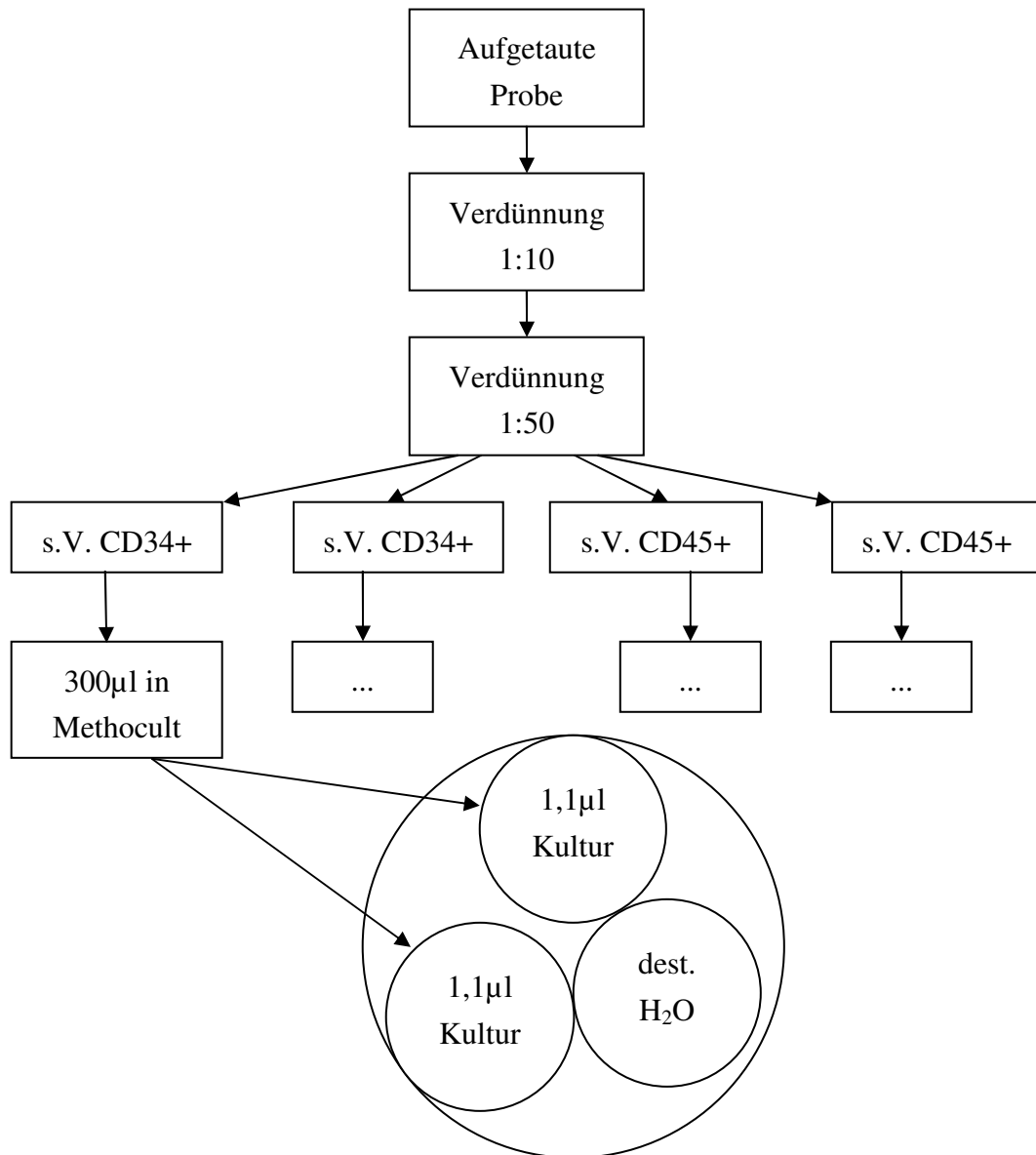
(Tab. 2: Material, Geräte, Reagenzien, Untersuchungsmaterial, S. 34-35)

Die Ansätze der Klonogenitätsanalyse der CFU-GM wurden wie zuvor beschrieben vorbereitet. Dabei wurden pro kryokonservierter Probe vier Röhren Methocult® (StemCell Technologies, British Columbia, Kanada) bei Raumtemperatur aufgetaut. Unter einer sterilen Werkbank wurden für jede Probe vier 100mm Schalen (Sarstedt Inc., Newton, USA) mit je drei 35mm Schälchen (Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland) vorbereitet.

Daraufhin wurden die Verdünnungsschritte mit IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium; Invitrogen, Auckland, NZ) vorpipettiert: auf eine erste Verdünnung im Verhältnis 1:10 und eine zweite im Verhältnis 1:50 folgte die spezifische Endverdünnung. Für jede kryokonservierte Probe ergaben sich im Endeffekt je zwei Endverdünnungen der zwei unterschiedlichen Versuchsmethoden.

Nach dem Auftauen der kryokonservierten Probe im Wasserbad (GLF mbH, Burgwedel, Deutschland) bei +37°C fand die Verdünnung gemäß der vorbereiteten Schritte mit anschließender Durchmischung mit einem Vortex (SI, Laboratory Equipment, Bohemia, USA) statt. Aus den spezifischen Endverdünnungen wurden 300µl in je ein Röhren Methocult gegeben und gründlich auf dem Vortex gemischt. Nach 5 Minuten Ruhezeit (zur Auflösung etwaiger Luftbläschen) wurden 2,2ml des Kulturgemisches mit einer speziellen Spritze (Syringe, StemCell Technologies) aufgezogen, davon je 1,1ml in zwei der 35mm Schälchen gegeben, mit dem Deckel verschlossen und die Methylzellulose mittels Kippen bis zur vollständigen Bedeckung des Bodens des Schälchens verteilt. Das dritte Schälchen wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt und der Deckel entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation der befüllten und geschlossenen 100mm Schale für 14 Tage im Inkubator (Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland) bei 95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO<sub>2</sub> und einer Temperatur von +37°C.

Abb. 1: Versuchsaufbau



Legende: s.V. = spezifische Verdünnung

## 2.6 Statistische Analyse

Zur statistische Analyse wurde die Software GraphPad Prism program (Version 4.00 for Windows, Graph Pad Software, San Diego, CA) verwendet.

Aus den vier Ansätzen je Versuchsmethode wurde der Mittelwert errechnet. Für die CD34-positiven Zellen erfolgte dies für alle 30 Proben, für die CD45-positiven Zellen nur für die ersten 14 Proben, da hier die Ansätze ab einer bestimmten Zellkonzentration übersät und nicht mehr auswertbar waren.

Für die Mittelwerte der 30 Ansätze der CD34-positiven Zellen wurde der Median berechnet. Die mediane Standardabweichung der einzelnen Werte vom Mittelwert wurde in Prozent für jede einzelne Probe ermittelt.

### Berechnungen:

1. Mittelwert (MW) der je 4 Ansätze (n):

$$MW = (\sum n_1, \dots, n_4) / 4$$

2. Standardabweichung (SD) des Mittelwertes:

$$SD = \sqrt{MW}$$

3. Varationskoeffizient (VK) des sechsfachen Ansetzens einer bekannten Probe ( $x_{1-6}$ ):

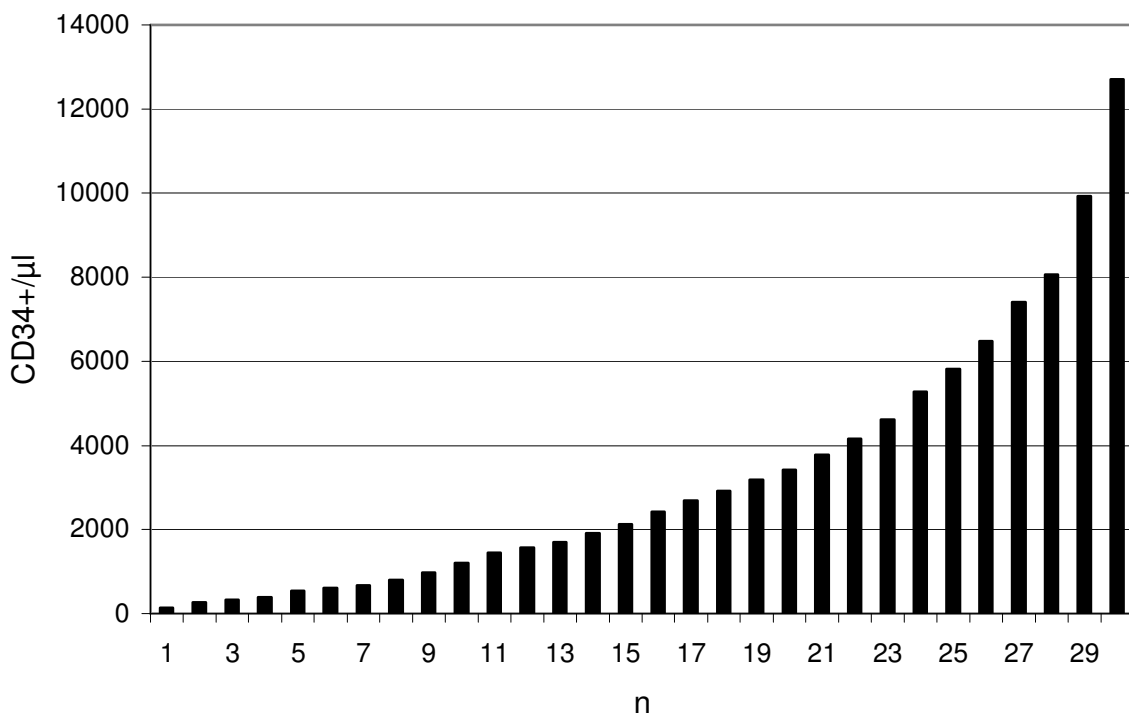
$$VK(x_{1-6}) = SD(x_{1-6}) / MW(x_{1-6})$$

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Analyse CD45-positiver Zellen und CD34-positiver Zellen

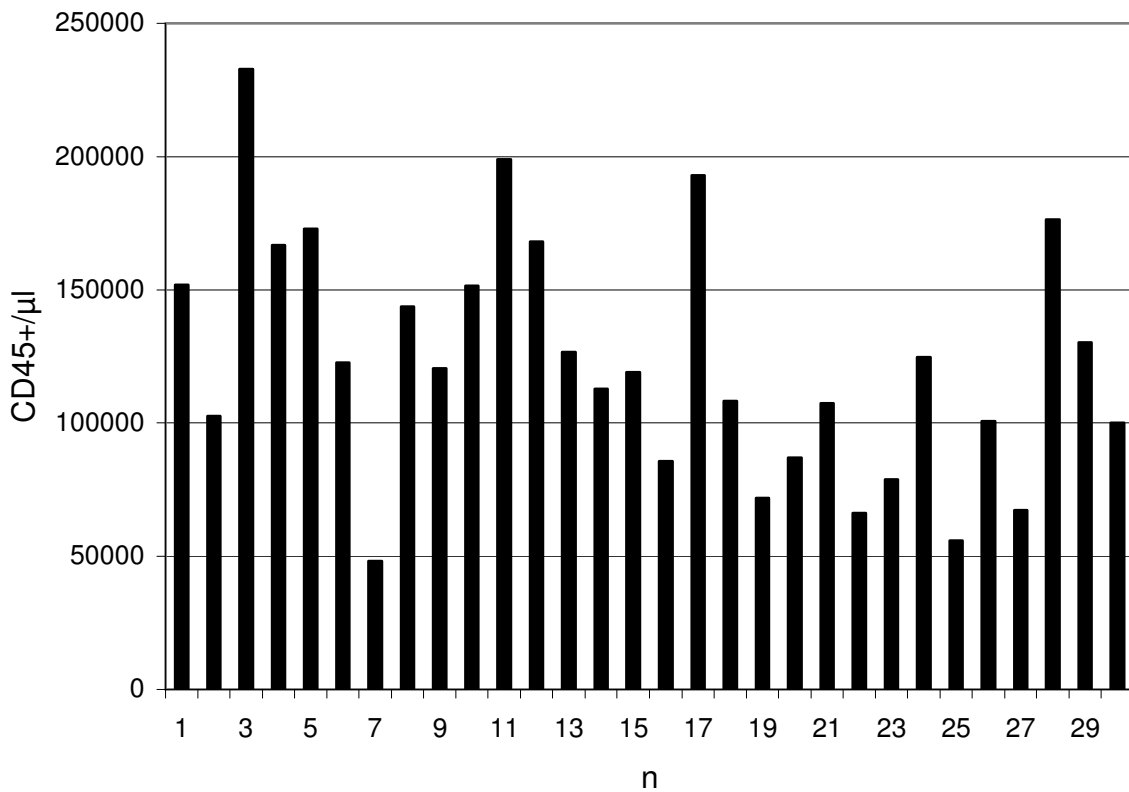
Die durchflußzytometrisch nach Kryokonservierung ermittelte Konzentration der 30 Proben reichte von 48.230 bis 232.700 CD45-positiven Zellen pro  $\mu\text{l}$  bzw. von 140 bis 12.710 CD34-positiven Zellen pro  $\mu\text{l}$  (Abb. 2, S. 14 und Abb. 3, S. 15). Dabei ergab sich für die Anzahl der CD45-positiven Zellen ein Median von 119.770 pro  $\mu\text{L}$  und für die Anzahl der CD34-positiven Zellen von 2.275 pro  $\mu\text{L}$ . Der prozentuale Anteil der CD34-positiven an den CD45-positiven Zellen betrug im Median 1,745 % und reichte von 0,09 bis 12,71% (Tab. 4, S. 20).

Abb. 2: Verteilung der Proben nach Anzahl CD34-positiver Zellen pro  $\mu\text{l}$



Legende: CD34+ = CD34-positiv Zellen

Abb. 3: Verteilung der Proben nach Anzahl CD45-positiver Zellen pro  $\mu\text{l}$



Legende: CD45+ = CD45-positive Zellen

### 3.2 Ansätze der koloniebildenden Einheiten

#### 3.2.1 Normierung auf vitale CD34-positive Zellen

Alle angesetzten Kulturen basierend auf einer festen Zahl von 200 vitalen CD34-positiven Zellen pro Platte waren auszählbar. Die Mittelwerte der 30 Proben (mit je 4 Ansätzen) reichten von 13 bis 81,75 Kolonien pro Schälchen (*Abb. 4, S. 17 und Tab. 3, S. 18-19*). Der Medianwert aus den Mittelwerten der 30 Proben ergab 48 CFU-GM (13-82 CFU-GM) je 200 vitaler CD34-positiver Zellen. Alle Ansätze liefern verwertbare Ergebnisse über einen 2-log-Bereich der CD34-positiven Zellkonzentration im Ausgangsprodukt.

Da das Ergebnis trotz unterschiedlichster Patienten homogen ist, scheinen die Vortherapie, die Diagnose, Alter und Geschlecht keinen Einfluß zu haben. Wir können demzufolge darauf schließen, dass der Klonogenitätstest unabhängig von

der Zellkonzentration und von Patienten spezifischen Einflußfaktoren ist.

Ein von uns aufgestellter Vergleich mit der theoretisch eingesetzten Menge CD34-positiver Zellen pro Ansatz auf der Basis von vor der Kryokonservierung ermittelten Zellkonzentrationen zeigte fast durchgängig eine zu geringe Anzahl an CD34-positiven Zellen auf.

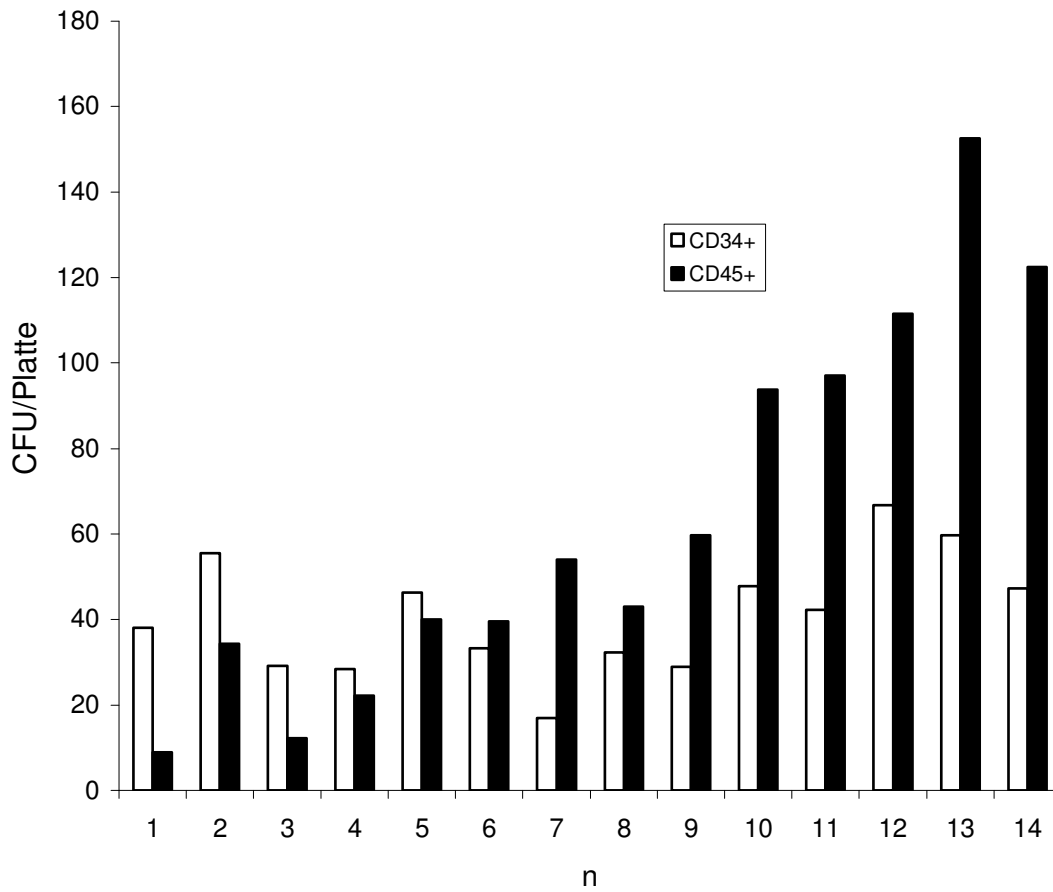
### 3.2.2 Normierung auf vitale CD45-positive Zellen

Von den Kulturschälchen mit der bisher verwendeten eingesetzten Zellzahl von  $0,5 \times 10^5$  CD45-positiven je Ansatz waren nur die ersten 14 Schälchen auswertbar. Die Mittelwerte aus den je vier Ansätzen der 14 Proben reichten von 9 bis 152,5 Kolonien pro Schälchen (*Tab. 3, S. 18-19*). Der Median aus den Mittelwerten der 14 Proben betrug 48 CFU-GM (9-153 CFU-GM). Die Kulturschälchen der restlichen 16 Proben waren übersät und somit nicht zähl- und auswertbar.

Stellt man die Mittelwerte der Kolonienzahlen der beiden Methoden graphisch dar (*Abb. 5, S. 22*), wird die Schwankungsbreite der herkömmlichen Methode basierend auf CD45-positiven Zellzahlen deutlich, während die Versuchsreihe mit den fest eingesetzten CD34-positiven Zellzahlen homogene Ergebnisse liefert.

Errechnet man die absolut eingesetzten CD34-positiven Zellen bei der Normierung auf CD45-positive Zellen, ergeben sich Werte zwischen 230 und 4.473 CD34-positiven Zellen pro Schälchen bei einem Median von 1.809 CD34-positive pro Schälchen (*Tab. 4, S. 20*).

*Abb. 4: Mittelwerte der Kolonienzahlen der je vier Ansätze von CD34-positiven (weiß) und CD45-positiven (schwarz) Zellen*



Legende: CFU = engl. Colony Forming Unit; CD34+ = CD34-positive Zellen;  
CD45+ = CD45-positive Zellen

*Tab. 3: Konzentrationen der Zellpopulationen in der jeweiligen Probe, Ergebnisse des klogogenen Wachstums in Abhängigkeit von der Normierung auf vitale CD34- oder vitale CD45-positive Zellen, Mittelwerte der Kolonienzahl aus den je vier Kulturansätzen*

<b>n</b>	<b>CD45-positive Zellen/<math>\mu</math>l</b>	<b>CD34-positive Zellen/<math>\mu</math>l</b>	<b>200 vitale CD34-positive Zellen MW der CFU/Platte</b>	<b><math>0,5 \times 10^5</math> CD45-positive Zellen MW der CFU/Platte</b>
1	151.910	140	38	9
2	102.650	260	55,5	34,25
3	232.700	330	29,25	12,25
4	166.790	390	28,5	22,25
5	172.870	550	46,25	40
6	122.630	610	33,25	39,5
7	48.230	670	17	54
8	143.750	800	32,25	43
9	120.500	980	29	59,75
10	151.540	1.200	47,75	93,75
11	199.000	1.440	42,25	97
12	168.150	1.570	66,75	111,5
13	126.610	1.700	59,75	152,5
14	112.960	1.920	47,25	122,5
15	119.040	2.130	47	--
16	85.690	2.420	81,75	--
17	192.960	2.690	47,5	--
18	108.340	2.920	63,75	--
19	71.950	3.180	53	--
20	87.110	3.430	53	--
21	107.400	3.780	41,75	--
22	66.320	4.160	60,25	--
23	78.960	4.610	31,5	--
24	124.680	5.270	46	--
25	55.880	5.820	45	--



Fortsetzung Tab. 3

<b>n</b>	<b>CD45- positive Zellen/<math>\mu</math>l</b>	<b>CD34- positive Zellen/<math>\mu</math>l</b>	<b>200 vitale CD34- positive Zellen MW der CFU/Platte</b>	<b><math>0,5 \times 10^5</math> CD45- positive Zellen MW der CFU/Platte</b>
26	100.730	6.480	67,25	--
27	67.290	7.410	77,25	--
28	176.420	8.060	56,75	--
29	130.250	9.930	47,75	--
30	100.010	12.710	50,25	--

Legende: CFU = Colony forming unit; MW = Mittelwert

*Tab. 4: Parameter der 14 auszählbaren Proben, die auf der Basis von  $0,5 \times 10^5$  CD45-positiven Zellen pro Platte angesetzt wurden*

<b>n</b>	<b>CD45-positive Zellen/<math>\mu</math>l</b>	<b>CD34-positive Zellen/<math>\mu</math>l</b>	<b>Anteil CD34-positiver Zellen in % der CD45-positiven Zellen</b>	<b>CD34-positive Zellen/Platte</b>
1	151.910	140	0,09	46,1
2	102.650	260	0,25	126,64
3	232.700	330	0,14	70,9
4	166.790	390	0,23	116,9
5	172.870	550	0,32	159,1
6	122.630	610	0,5	248,72
7	48.230	670	1,39	694,59
8	143.750	800	0,56	278,26
9	120.500	980	0,81	406,64
10	151.540	1.200	0,79	395,94
11	199.000	1.440	0,72	361,8
12	168.150	1.570	0,93	466,85
13	126.610	1.700	1,34	671,35
14	112.960	1.920	1,7	849,86

### Rechenschritte in Bezug auf Tab. 4

**Schritt 1:** durchflusszytometrisch ermittelte Konzentration CD45-positiver Zellen (1:10 verdünnt) pro  $\mu\text{l}$  / 5

→ ergibt die CD45+-Konzentration in der 1:50-Verdünnung (A)

**Schritt 2:**  $50.000 / A$

→ ergibt die Menge an CD45-positiven-Verdünnung in  $\mu\text{l}$ , die für eine Konzentration von  $0,5 \times 10^5$  CD45+ pro Platte benötigt werden (B)

**Schritt 3:** durchflusszytometrisch ermittelte Ausgangskonzentration CD34-positiver Zellen in der 1:50-Verdünnung x B

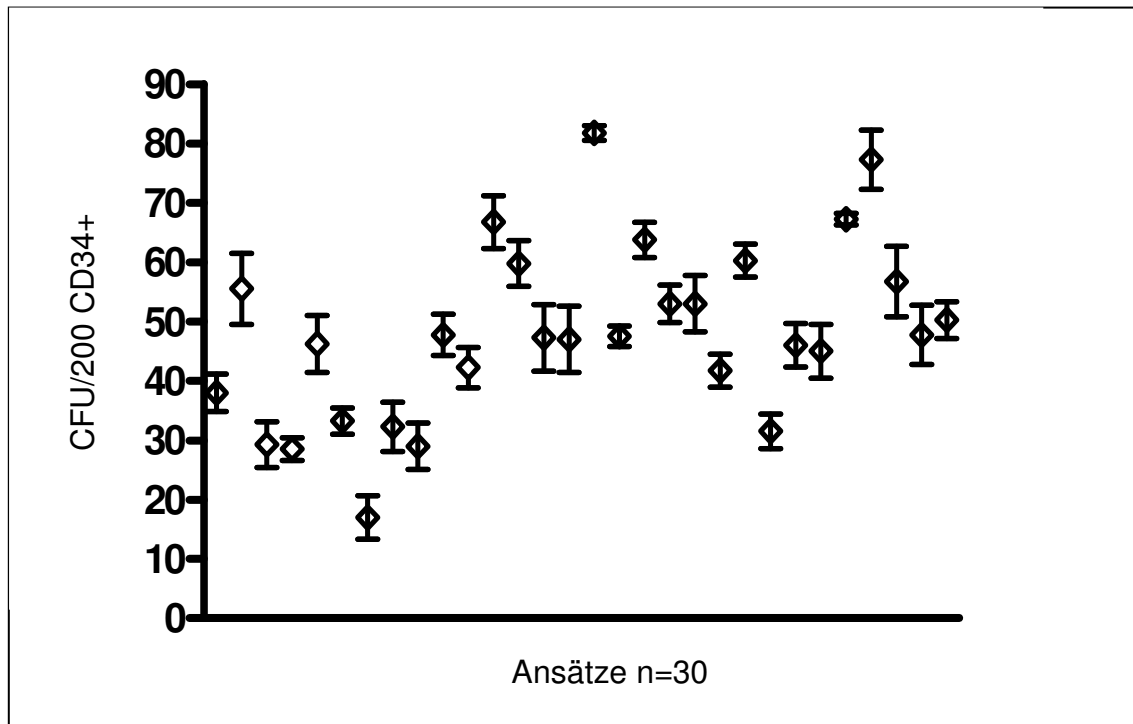
→ ergibt die absolute Anzahl an CD34-positiven Zellen pro Platte

### 3.2.3 Streuung der Klonogenitätsanalyse

Die Standardabweichung, als Maß für die Streuung der Werte um den Mittelwert der je vier Ansätze, wurde aus der Wurzel des jeweiligen Mittelwertes berechnet. Die mediane Standardabweichung in der Zählung der 30 Proben der CD34-positiven Gruppe belief sich auf 6,9 (4,12-8,79), bzw. 8% (1,5-21%) (Abb. 5, S. 22 und Abb.6, S.23).

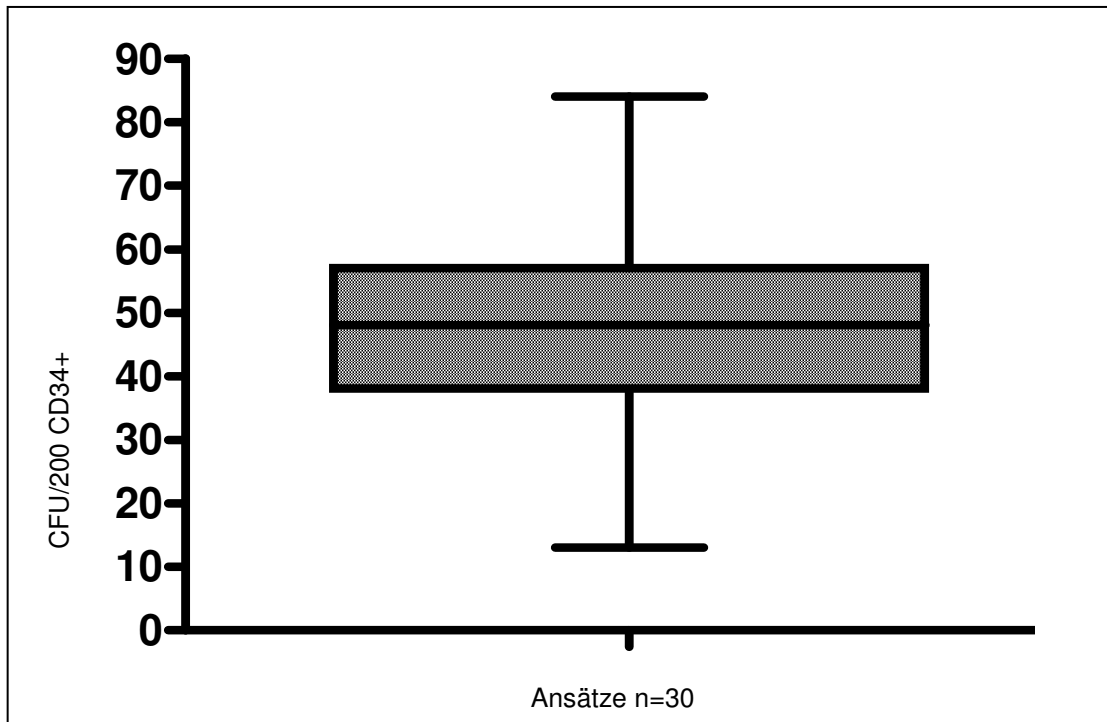
Der Variationskoeffizient aus der sechsfach angelegten bekannten Probe (n=24 Wiederholungsmessungen) betrug 18,8%.

Abb. 5: Kolonienwachstum der CD34-positiven Zellen mit Standardabweichung



Legende: CFU = Colony forming unit; CD34+ = CD34-positive Zellen

*Abb. 6 Graphische Darstellung der Verteilung der Koloniezahl pro 200 eingesetzter CD34-positiver Zellen für die 30 analysierten Proben*



Legende: CFU = Colony forming unit; CD34+ = CD34-positive Zelle

## 4. Diskussion

Im Rahmen der PBSC-Therapie dienen Qualitätskontrollen nach Kryokonservierung der Qualitätssicherung des Prozesses. Sie ermöglichen, eventuelle im Verarbeitungsprozess aufgetretene Abweichungen und die daraus resultierenden Qualitätsverluste aufzudecken. Die Aussagekraft dieser Kontrollverfahren über die Qualität und Quantität des zu transfundierenden Transplantates wird z.Z. verstärkt erforscht (Yang et al. 2005).

Von den angewandten Verfahren ermöglicht die Durchflußzytometrie, Zellzahl und Zellmembranintegrität zu evaluieren. Eine Aussage über das Zellproliferationspotential kann bisher einzig der Klonogenitätstest treffen. Bei letzterem Test ist es bisher aufgrund eingeschränkter Reproduzierbarkeit und somit Aussagekraft nicht möglich, eine präzise Voraussage über die vorliegende Qualität und benötigte Quantität eines Transplantats und somit über den Erfolg der Transplantation zu geben.

Studien der letzten Jahre zeigen unterschiedliche Ansätze zur Steigerung der Verlässlichkeit des Klonogenitätstest, um durch ihn richtungsweisende Informationen für die Transplantation zu erhalten. Im folgenden werden diese Ansätze aufgeführt und den verwendeten Ansätzen in der hier vorliegenden Studie gegenübergestellt.

### 4.1 Verfahren beim Anlegen und Auszählen von Kulturen

#### 4.1.1 Waschschritte

Im Sinne der Eliminierung des Frostschutzmittels (DMSO) und des durch den Gefriervorgang entstandenen Zelldebris wurden bisher nach dem Auftauen des Proberöhrchens bis zu zwei Waschgänge vor den eigentlichen Verdünnungsschritten vorgenommen (Humpe et al. 1997, Sheikazadeh et al. 2001, Feugier et al. 2003).

Yang et al. (2003, 2005) zeigt in seiner Arbeit, dass er hinsichtlich des DMSO alleinig mit Verdünnungsschritten unter die Toxizitätsgrenze des Frostschutzmittels von 0,1% gelangt und somit weitere durch die mechanische Manipulation entstehende Zellverluste umgehen kann.

Betrachtet man die reale Transplantationssituation, findet auch hier alleinig der

Verdünnungseffekt allerdings im Transplantatempfänger durch die umgehende Transfusion nach dem Auftauen des Transplantats Anwendung.

In Anlehnung an Yang et al. und im Sinne der Imitation der Transplantationssituation sind in den Versuchen der vorliegenden Studie die Waschvorgänge eliminiert worden. Es wird statt dessen nach dem Auftauen der Pilotröhrchen umgehend mit den Verdünnungsschritten begonnen.

#### 4.1.2 Verwendung von Zellart und Zellkonzentration

Das Anlegen der Kulturen unterscheidet sich in den Studien hinsichtlich der verwendeten Zellart und Zellkonzentration. Es werden entweder unterschiedliche Konzentrationen CD45-positiver Zellen angelegt (Humpe et al. 1997, Yang et al. 2003 und Feugier et al. 2003), oder eine bestimmte Anzahl CD34-positiver Zellen (Sheikhzadeh et al. 2001 und Yang et al. 2005).

Die verwendete Konzentration an CD45-positiven Zellen pro Kulturschälchen schwankt zwischen  $1 \times 10^4$  oder  $4 \times 10^4$  (Feugier et al. 2003),  $5 \times 10^4$  (Yang et al. 2003) und  $1,5 \times 10^5$  (Humpe et al. 1997). Für die Konzentration CD34-positiver Zellen findet man Werte zwischen 100 (Sheikhzadeh et al. 2001) und  $1 \times 10^3$  CD34-positiven Zellen pro Kulturschälchen (Yang et al. 2005).

Im Sinne einer verlässlichen und konstanten Zellkonzentration und Zellart wurden in der vorliegenden Studie eine Versuchsreihe mit 200 vitalen CD34-positiven Zellen pro Kulturschälchen und im Vergleich dazu eine Versuchsreihe mit einer konstanten Konzentration an  $0,5 \times 10^5$  vitalen CD45-positiven Zellen angelegt. Letztere zeigte eine große Streubreite im Kolonienwachstum pro Schälchenn ( $9-153$  CFU-GM). Mit steigender Konzentration der CD34-positiven Zellen fanden sich übersäte Schälchen, wodurch 16 der 30 Proben nicht auszählbar waren. Dieses Phänomen begründet sich in der anfangs geringen, später hohen und zudem variablen Konzentration der CD34-positiven Zellen an den CD45-positiven Zellen (Tab. 4, S. 19).

In der Kulturreihe, die auf einer festen Zahl vitaler CD34-positiven Zellen basierte, ergab die mediane Standardabweichung dagegen 8% (1,5-21%) mit einer Streubreite von 13-82 CFU-GM pro Schälchen. Keines der Schälchen der 30 Proben war übersät, noch fanden sich Platten ohne Wachstum.

Der Vergleich der beiden Kulturreihen zeigt konstante und sichtbar reproduzierbare,

verlässliche Ergebnisse bei Verwendung einer festen Zahl vitaler CD34-positiver Zellen. Man kann folglich eine Aussage darüber treffen, wieviele Kolonien aus 200 vitalen CD34-positiven Zellen hervorgehen und es ermöglicht somit eine valide Aussage über die Proliferationsfähigkeit der Stammzellen.

#### 4.1.3 Zellzählung vor und nach Kryokonservierung

Die für die Kultivierung ermittelten Zellkonzentrationen beziehen sich in vorigen Studien mit Ausnahme von Sheikhzadeh et al. (2001) auf Zählungen vor Kryokonservierung. Effekte des Gefriervorganges auf die Zellen und deren einzelne Populationen sind bei dieser Vorgehensweise nicht einkalkuliert. Die Zellkonzentrationen, die auf Zellzählung vor Kryokonservierung basieren können folgedessen zu großen Schwankungen in den Ergebnissen führen – sogar unabhängig davon, ob man eine bestimmte Konzentration an CD45-positiven Zellen oder an CD34-positiven Zellen als Ausgangsbasis verwendet.

In dieser Studie wurde deshalb ausschließlich mit durchflußzytometrischen Zählungen nach Kryokonservierung als Basis gearbeitet.

#### 4.1.4 Verwendung eines einheitlichen Nährmediums

Bis vor einigen Jahren war es durchaus verbreitet, Zellkulturmedien und Nährböden in einzelnen Institutionen selbst herzustellen. Mit zunehmenden Anforderungen hinsichtlich einer gleichbleibenden und reproduzierbaren Qualität dieser Medien kam es zur Einführung industriell vorgefertigter Kulturreagenzien. Für die Klonogenitäts-Assays und dabei speziell für den Nachweis von CFU-GM ist inzwischen das Reagenz Methocult® (StemCells) am weitesten verbreitet. Dabei handelt es sich um ein einheitliches semisolid Medium mit einer definierten Zusammensetzung von Inhaltsstoffen und Wachstumsfaktoren. Damit gelingt es hinsichtlich des Nährbodens konstante Bedingungen zu schaffen (Sheikhzadeh et al. 2001). Sowohl Feugier et al. (2003) als auch Yang et al (2003, 2005) gebrauchen Methocult® für den Klonogenitäts-Assay.

Auch in der hier vorliegenden Studie wurde ausschließlich Methocult® angewendet.



#### 4.1.5 Anzahl der Kulturansätze

Weiterhin finden sich in der Anzahl der Kulturansätze abwechselnd Triplikate und Duplikate. Die Firma StemCells®, Hersteller von Methocult, gibt als Empfehlung, Duplikate bei bekanntem und Triplikate bei unbekanntem Material anzulegen.

Im Sinne verlässlicher Ergebnisse zur Vergleichsaufstellung wurden in dieser Arbeit für jede Probe in beiden Versuchsreihen Quadruplikate angelegt.

#### 4.1.6 Definition der Zellkolonie

Als Zellkolonie wird die Proliferation von Tochterzellen aus einer Stammzelle bezeichnet. In den Studien von Sheikhzadeh et al. (2001) und Feugier et al. (2003) wurden Kolonien ab einer Menge von 50 zusammengelagerten Zellen als Kolonie gewertet. In den Empfehlungen von StemCells wird die Koloniegröße der CD34-positiven Zellen allerdings zwischen 20 und 1000 Zellen beschrieben (Oostendorp et al. 2002).

Es erscheint daher sinnvoll, den Empfehlungen von StemCells folgend, Zellansammlungen ab 20 Zellen als Kolonien zu werten.

#### 4.2 Konsequenzen fehlender Standardisierung

Ergebnisse der Kolonieansätze sind aufgrund fehlender Standardisierung intra- und interlaboratorisch nicht vergleichbar.

Aus älteren Studien zitiert Humpe et al. (1997) Variationskoeffizienten bei Kolonieansätzen von 0-304%. In der zentrenübergreifenden Studie von Serke et al. (1997) zeigen sich in den Zentren noch Variationskoeffizienten von bis zu 30%. Sheikhzadeh et al. (2001) erreicht unter Verwendung einer nach Kryokonservierung durchflußzytometrisch ermittelten festen Zahl CD34-positiver Zellen einen Variationskoeffizienten von 13%. Er reagiert damit auf die unterschiedlichen Reaktionen der Subpopulation der CD45-positiven Zellen auf die Kryokonservierung (durch das Gefrierverfahren sterben v.a. Neutrophile ab, kaum aber CD34-positiv (Yang et al. 2005)). Durch seine durchgeführten Waschschriffe können aber

unkontrollierte Zelllyse und Zellverluste auftreten. Yang et al. (2005) eliminieren diese Waschschrte und nutzen ebenfalls eine feste Zahl CD34-positiver Zellen für das Anlegen der Kolonien, allerdings auf der Basis von Zellzahlen vor Kryokonservierung. Nachteil dieser Methode ist, dass Zellverluste durch das Gefrierverfahren nicht berücksichtigt werden.

Um all die aufgeführten, für den Assay relevanten Parameter zu berücksichtigen und zu kontrollieren, wurden für die vorgelegte Arbeit Bedingungen für die Qualitätskontrolle mit dem Klonogenitätstest festgelegt. Diese dienten in den Versuchsreihen der Studie als Standard und werden im folgenden Abschnitt zusammengefasst.

#### 4.3 Standardisierung für die Qualitätskontrolle in den Zentren

Die Konzentration von CD34-positiven Zellen an CD45-positiven Zellen in hämatopoetischen Progenitorzellprodukten ist gering (ca. 2%) und variiert individuell. Ein Testverfahren auf der Basis einer Konzentration an CD45-positiven Zellen kann aufgrund des variablen Anteils an CD34-positiven Zellen nicht das Verfahren der Wahl darstellen. Im Sinne einer Standardisierung sollte demzufolge der Klonogenitätstest mit 200 vitalen CD34-positiven Zellen auf Basis der nach Kryokonservierung durchflußzytometrisch ermittelten Konzentration angelegt werden, um große Schwankungen in den Zählungen bei Verwendung von CD45-positiven Zellen zu vermeiden.

200 vitale CD34-positive Zellen je Schale scheinen für den Zählkomfort und die Mindestanzahl pro Kulturschälchen eine ideale Konzentration zu sein. 100 vitale CD34-positive Zellen pro Kulturschälchen (Sheikhzadeh et al. 2001) erscheinen zu gering, da in der vorliegenden Arbeit teilweise Platten mit 13 Kolonien auftraten. Platten mit über 80 Kolonien lagen bereits an der Grenze des Zählkomforts, so dass 500 vitale CD34-positive Zellen (Yang et al. 2005) mit Sicherheit eine zu hohe Anzahl für die Kultivierung darstellen. Bei allogenen gesunden Spendern werden im MSH in Kiel die Kulturen mit 100 vitalen CD34-positiven Zellen angelegt.

Nach dem Auftauen der Proben sollte umgehend die Verdünnung ohne vorausgehende Waschschrte erfolgen, um weitere mechanische Schädigungen zu

vermeiden. Die Zeit vom Auftauen der kryokonservierten Probe bis zum Ansetzen in semisolidem Medium beläuft sich so auf weniger als 20 Minuten und ist folglich mit der Situation während der Transplantation vergleichbar. DMSO liegt in den Endverdünnungen unterhalb der toxischen Grenze von 0,1% (Feugier et al. 2003) bei geringster mechanischer Manipulation.

Für konstante Bedingungen beim Kolonienwachstum sollte durchgehend das vorgetestete semisolid Medium Methocult® (StemCells) verwendet werden. Die Inkubationszeit beläuft sich wie bekannt auf 14 Tage. Kolonien ab 20 Zellen sollten gewertet werden.

Durch die manuelle Zählung ist eine Abhängigkeit vom Operator vorhanden. Mit einheitlichen Zählkriterien und individuellem Training und Schulungen, wie schon von Sheikhzadeh et al. (2001) gefordert, kann die unkomplizierte Zählung allerdings einen akzeptablen Variationskoeffizienten und somit valide und vergleichbare Ergebnisse erzielen.

Die konstanten Werte bei einer festen Anzahl eingesetzter vitaler CD34-positiver Zellen sprechen zudem für eine Unabhängigkeit von Alter, Grunderkrankung und Vortherapie des Patienten und zeigen somit das wahre Proliferationspotential vitaler CD34-positiver Zellen.

Ob über den Colony Assay die Definition einer Schwellendosis der Zellkolonien als Prädiktor für gute Transplanationsbedingungen nach Kryokonservierung aufgestellt werden kann, bleibt noch offen.

## 5. Zusammenfassung

In der Stammzelltherapie mit HPZ ermöglichen Qualitätskontrollen vor und nach Kryokonservierung, quantitative oder qualitative Veränderungen der HPZ durch den Gefrier- und Auftauvorgang sowie durch die Langzeitlagerung rechtzeitig aufzudecken. So können Risiken im Rahmen der Transplantation vorgebeugt werden. Der Klonogenitätstest als eine mögliche Qualitätskontrolle nach Kryokonservierung zeigte bisher durch fehlende Standardisierung hohe Varianzen zwischen den Zentren sowie innerhalb eines Zentrums.

In der vorliegenden Arbeit wurden aus einem Kollektiv von 563 kryokonservierten Proben 30 Proben verschiedener Patienten mit unterschiedlichen malignen Erkrankungen so ausgewählt, dass sich die Konzentration der CD34-positiven Zellen pro  $\mu\text{L}$  der Proben über einen Bereich von fast 2 log Stufen gleichmäßig verteilte. Mit dem Probenmaterial wurden zwei Versuchsreihen vergleichend angelegt. Die erste basierte auf der standardmäßig angewendeten Konzentration von  $0,5 \times 10^5$  vitalen CD45-positiven Zellen pro Schälchen, die zweite wurde mit je 200 vitalen CD34-positiven Zellen pro Schälchen angelegt. Die Zellkonzentrationen waren zuvor durchflusszytometrisch nach Kryokonservierung bestimmt worden. Bei dem Ansatz der Kolonien wurden Waschschrte nach dem Auftauen eliminiert und alleinig Verdünnungsschritte durchgeführt, um die Konzentration von DMSO im Ansatz unter den kritischen Schwellenwert von 0,1% zu bringen. Die Klongenitätsanalysen erfolgten mit einem standardisierten, kommerziell verfügbaren, Medium (Methocult®). Die Auswertung wurde nach 14-tägiger Inkubation mikroskopisch vorgenommen.

Die Resultate zeigen, dass die Standardisierung des Klonogenitätstests auf 200 vitale CD34-positive Zellen pro Ansatz zu auswertbaren Ergebnissen führt, unabhängig von der ursprünglichen Konzentration der CD34-positiven Zellen im Ausgangsmaterial. Es gab keinerlei Ansätze, bei denen das klonogene Potential aufgrund zu niedriger oder zu hoher Wachstumsdichte nicht auswertbar war. Die Normierung des Ansatzes auf nach Kryokonservierung ermittelte Zellzahlen eliminiert den möglichen Einfluss von Konzentrationsverschiebungen innerhalb der Zellsuspension durch die Manipulationen. Die Elimination der Waschschrte vermeidet zusätzlichen Verlust vitaler Zellen.

Insgesamt schafft das etablierte Verfahren hinsichtlich der Zellkonzentration und des Zeitaufwandes eine der Transplantation vergleichbaren Situation.

Mit den in der Arbeit vorgestellten Standardisierungen kann der Klonogenitätstest als valides und reproduzierbares Verfahren für die Analyse der Proliferationskapazität von kryokonservierten Transplantaten verwendet werden.

## 6. Literaturverzeichnis

Civin C. I., Strauss L. C., Brovall C., Fackler M. J., Schwartz J. F. and Shaper J. H. (1984): Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG- 1a cells. *J Immunol*, 133, 157-185

Domen J., Wagers A., Weissman I. L. (2006): Bone marrow (hematopoietic) stem cells. *Regenerative Medicine*, 13-34

Feugier P., Bensoussan D., Girard F., Alla F., Schuhmacher A., Latger-Cannard V., Hulin C., Witz F., Witz B., Carret A. S., Bordignon P., Lenderlin P., Janot C. (2003): Hematologic recovery after autologous PBPC transplantation: importance of the number of postthaw CD34+ cells. *Transfusion*, 43, 878-884.

Humpe A., Riggert J., Vehmeyer K., Troff C., Hiddemann W., Köhler M., Wörmann B. (1997): Comparison of CD34+ cell numbers and colony growth before and after cryopreservation of peripheral blood progenitor and stem cell harvests: influence of prior chemotherapy. *Transfusion*, 37, 1050-1057.

Humpe A., Beck A., Schock R., Kneba M., Horst H.-A. (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, 1208-1213

Keeney M., Chin-Yee I., Weir K., Popma J., Nayar R., Sutherland R. (1998): Single platform flow cytometric absolute CD34 cell counts based on the ISHAGE guidelines. *Cytometry*, 34, 61-70

Matthes G., Moog R., Radtke H., Wiesneth M., Zingsem J. (1998): Durchführung präparativer zellulärer Hämapheresen zur Gewinnung von Blutbestandteilkonzentraten – Empfehlungen zur Blutstammzellapherese der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI). *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin*, 25, 325–335

Mueller-Eckhard C., Kiefel V. (2004): Transfusionsmedizin: Grundlage – Therapie – Methodik. 3. Auflage, Springer, Berlin

Oostendorp R., Arseniev L., Griesel C., Peine S. (2002): Kultivierung erythrozytärer, granulozytärer Vorläuferzellen: der Kolonie-Assay (CFC Assay). CFC CellSystems GmbH

Ottinger H. D., Beelen D. W. (2006): Vom Konzept zur klinischen Anwendung - Zelluläre antileukämische Immuntherapie bei der allogenen Blutstammzelltransplantation. Essener Unikate, 27, 60-73

Ottinger H., Müller C., Beelen D. W., Ehninger G., Schmitz N., Zander A., Schrezenmeier H. (2006): Entwicklungen in der hämatopoetischen Stammzelltransplantation. Deutsches Ärzteblatt, 37, A2381-A2386

Serke S., Arseniev L., Watts M., Fritsch G., Ingles-Esteve J., Johnson H. E., Linch D., Cancelas J. A., Meyer O., Kadar J. G., Huhn D., Matcham J. (1997): Imprecision of counting CFU-GM colonies and CD34-expressing cells. Bone Marrow Transplantation, 20, 57-60.

Sheikhzadeh S., Hammers H. J., Hartwig D., Kirchner H., Schlenke P. (2001): Improvement of the precision in CFU-GM and BFU-E counting by flow cytometry-based standardization of short-term culture assays. J of Hematother Stem Cell Res, 10, 881-885

To L. B., Haylock D. N., Simmons P. J., Juttner C. A. (1998): The biology and clinical uses of blood stem cells. Blood, 89, 2233-2258

Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer unter Mitwirkung des Paul-Ehrlich-Institutes (1997): Richtlinien zur Transplantation peripherer Blutstammzellen. Deutsches Ärzteblatt, 23, A1584-A1592

Yang H., Acker J. P., Cabuhat M., McGann L. E. (2003): Effects of incubation temperature and time after thawing on viability assessment of peripheral hematopoietic progenitor cells cryopreserved for transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 32, 1021-1026

Yang H., Acker J. P., Cabuhat M., Letcher B., Larratt L., McGann L. E. (2005): Association of post-thaw viable CD34+ cells and CFU-GM with time to hematopoietic engraftment. *Bone Marrow Transplant*, 35, 881-887



## 7. Anhang

Tab. 2: Geräte, Materialien, Reagenzien, Untersuchungsmaterial

<p><u>Geräte</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wasserbad Typ 1002, GLF®, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland</li> <li>• Vortex Genie 2 (Modell G-560E, Serie 2-99053), Scientific Industries, Inc. (SI®), Laboratory Equipment, Bohemia, USA</li> <li>• CO<sub>2</sub>-Inkubator HERAcell 240, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland</li> <li>• Inversmikroskop, Ref. 031396, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland</li> <li>• Pipetus®-akku, Hirschmann® Laborgeräte GmbH &amp; Co. KG, Eberstadt, Deutschland</li> <li>• Pipette Eppendorf Reference®, Ref. 2359883, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland             <ul style="list-style-type: none"> <li>• 10-100µl</li> <li>• 100-1000µl</li> </ul> </li> </ul>
<p><u>Reagenzien</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IMDM, 500ml-Flaschen, steril, + L-Glutamine, + 25mM HEPES, Ref. 21980, Auckland, Neuseeland</li> <li>• Dest. H<sub>2</sub>O</li> <li>• MethoCult® GF H4534, CellSystems®, StemCell Technologies Inc., British Columbia, Kanada             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Methylzellulose basiertes Medium mit rekombinanten Zytokinen für humane Granulozyten und Makrophagen</li> <li>• Inhalt: Methylzellulose, fetales bovines Serum, bovines Serumalbumin, 2-Mercaptoethanol, Supplemente, rh Stammzellefaktor, rh GM-CSF, rh IL-3, IMDM</li> </ul> </li> </ul>

<u>Materialien</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gewebekulturschalen, steril <ul style="list-style-type: none"> <li>• 100x20mm, Typ 83.1802, Sarstedt, Inc., Newton, USA</li> <li>• 35x10mm, Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland</li> </ul> </li> <li>• Rasterschale, Nunc™ A/S, Roskilde, Dänemark</li> <li>• Rörchen: Cryo Tube™ Vials, steril, 1,8ml, Ref. 363401, Nunc™ A/S, Roskilde, Dänemark</li> <li>• Pipettenspitzen: Eppendorf epT.I.P.S., Singles (Eppendorf Biopur), steril, einzeln verpackt, 2-200µl (gelb), 50-1000µl (blau), Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</li> <li>• Spritzen: Syringes 3cc, StemCell Technologies Inc., The Cell Experts™, British Columbia, Kanada</li> <li>• Kanülen BD Microlance™ 3, 18 G 1½", 1,2x40mm, steril, Ref. 304622, Drogheda, Irland</li> <li>• Röhren 50ml, steril, 114x28mm, Ref. 62.547.254, Sarstedt Aktiengesellschaft &amp; Co., Nümbrecht, Deutschland</li> </ul>
<u>Untersuchungs-material</u>	Kryokonservierte Proben in CryoTubes 1,0ml (Nunc™, Roskilde, Dänemark)

## 8. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung	Seite
Abbildung 1: Versuchsaufbau	12
Abbildung 2: Verteilung der Proben nach Anzahl CD34-positiver Zellen pro $\mu\text{l}$	14
Abbildung 3: Verteilung der Proben nach Anzahl CD45-positiver Zellen pro $\mu\text{l}$	15
Abbildung 4: Mittelwerte der Kolonienzahlen der je vier Ansätze von CD34-positiven (weiß) und CD45-positiven (schwarz) Zellen	17
Abbildung 5: Kolonienwachstum der CD34-positiven Zellen mit Standardabweichung	22
Abbildung 6: Graphische Darstellung der Verteilung der Koloniezahl pro 200 eingesetzter CD34-positiver Zellen für die 30 analysierten Proben	23
Tabelle	Seite
Tabelle 1: Patientenkollektiv, Diagnose und Mobilisierungsprotokolle	9
Tabelle 2: Geräte, Materialien, Reagenzien, Untersuchungsmaterial	35-36
Tabelle 3: Konzentrationen der Zellpopulationen in der jeweiligen Probe, Ergebnisse des klogogenen Wachstums in Abhängigkeit von der Normierung auf vitale CD34- oder vitale CD45-positive Zellen, Mittelwerte der Kolonienzahl aus den je vier Kulturansätzen	18-19
Tabelle 4: Parameter der 14 auszählbaren Proben, die auf der Basis von $0,5 \times 10^5$ CD45-positiven Zellen pro Platte angesetzt wurden	20

## **Danksagung**

Der größte Dank richtet sich an meinen Doktorvater PD Dr. med. Andreas Humpe, ohne den diese Doktorarbeit natürlich nicht entstanden wäre und der mich mit all seinem Wissen unterstützt hat. Sein unvergleichlicher Humor und sein Optimismus konnte jede Motivation aufrecht erhalten.

Ein großer Dank geht an das Team der MTAs des GMP-Labors des Dr. Mildred-Scheel-Hauses, Kiel, die mich ebenfalls mit Rat und Tat unterstützten und immer ein fröhliches Lächeln auf den Lippen trugen, was zu einer sehr angenehmen Atmosphäre im Labor führte.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Julia Fasold  
 Adresse: Kunkeldanweg 11d, 18055 Rostock  
 Telefon: 0381-2032591  
 Geboren: 22.03.1982  
 Geburtsort: Schwerin

Familienstand: ledig, 1 Kind

### Schulbildung

1998 - 1992 Kalinin-Grundschule, Schwerin  
 1992 – 1998 Herder-Gymnasium, Schwerin  
 1998 – 1999 Nampa High School, Idaho, USA  
 1999 – 2002 Gymnasium Am Sonnenkamp, Neukloster

### Studium

seit Okt 2002 Studium der Humanmedizin, CAU zu Kiel

Aug 2004 Physikum

seit Febr 2006 Promotionsthema: „Qualitätskontrolle in der Transplantation hämatopoetischer Progenitorzellen – Optimierung und Standardisierung der Testung klonogenen Wachstums“

### Veröffentlichungen

Jun 2007 Abstract der Doktorarbeit zum 40. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e.V. (DGTI)

## **Praktische Tätigkeiten**

### Praktisches Jahr (25.02.2008-25.01.2009)

- |                        |   |
|------------------------|---|
| Febr - Jun 2008        | Hämatologische Onkologie, Städtisches Krankenhaus, 2. Medizin, Kiel |
| Jun - Okt 2008         | Pädiatrie, Hôpital Nord, Marseille, Frankreich                      |
| Okt 2008<br>- Dez 2009 | Chirurgie, Martin-Luther-Krankenhaus, Schleswig                     |

### Famulaturen

- |                 |  |
|-----------------|--|
| Sept 2006       | Dermatologie, Hôpital Hôtel Dieu, Lyon, Frankreich (3 Wochen)                          |
| März - Apr 2006 | Praxis für Gynäkologie und Geburtshilfe, Dr. med. Beate Vogt-Weber, Rostock (5 Wochen) |
| Sept - Okt 2005 | Gefäß- und Viszeralchirurgie, HIA Sainte Anne, Toulon, Frankreich (7 Wochen)           |
| März - Apr 2005 | Hämatologische Onkologie, Städtisches Klinikum, 2. Medizin, Kiel (4 Wochen)            |

### Pflegepraktika

- |           |  |
|-----------|--|
| März 2003 | Gynäkologie, Parkklinik, Kiel (4 Wochen)                                     |
| Febr 2003 | Gynäkologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel (4 Wochen) |

### weitere Praktika und Aktivitäten

- |                 |  |
|-----------------|--|
| Febr - Jul 2007 | praktisches Auslandssemester mit ERASMUS, Université de Bourgogne, Dijon, Frankreich<br>je 4 Wochen Chirurgie, Pädiatrie, Gynäkologie, Kardiologie, Allgemeinmedizin |
|-----------------|--|

Mai 2006 - Mai 2008	Minijob als Nachtwache, Schlafzentrum Kiel, Sankt Elisabeth Krankenhaus
Jun - Jul 2005	OP-Assistenz, Parkklinik, Kiel
Okt - Nov 2004	Hilfskraft für den Kurs „Makroskopische Anatomie“, CAU zu Kiel
Okt 2004 - Jan 2007	Mitglied der BVMD (Bundesvereinigung Medizinstudierender Deutschlands), davon acht Monate Koordinatorin für Öffentliche Gesundheit

### **Weitere Kenntnisse, Interessen und Hobbys**

#### Fremdsprachen

Seit 1990	Englisch (sehr gut in Verständnis, Sprache und Schrift)
Seit 1993:	Französisch (sehr gut in Verständnis, Sprache und Schrift)

#### Hobbys

seit 1988	Violine spielen
seit 2002	Taekwondo
seit 2007	Kayak

#### EDV-Kenntnisse

Words, Excel, Power Point