

Aus der Abteilung für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie
In der Chirurgischen Klinik
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Leiter: Prof. Dr. R. Eckstein

Thema

Vergleich verschiedener Techniken zur Anreicherung hämatopoetischer Stammzellen aus
Plazentarestblut

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
an der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

Vorgelegt von
Moritz Krätzer
aus
München



Gedruckt mit Erlaubnis der
Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

Dekan:	Prof. Dr. J. Schüttler
Referent:	Prof. Dr. R. Eckstein
Korreferent:	Prof. Dr. W. Hohenberger
Tag der mündlichen Prüfung:	27.01.2010

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung zur Doktorarbeit	2
2.1	Hochdosismotherapie und Transplantation hämatopoetischer Stammzellen	2
2.2	Formen der Transplantation	3
2.2.1	Allogene Knochenmarkstransplantation	3
2.2.2	Autologe Knochenmarkstransplantation	5
2.2.3	Blutstammzelltransplantation im Vergleich zu Knochenmarkstransplantation	6
2.3	Mobilisierung autologer Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut	8
2.4	Das CD34 Antigen	9
2.5	Das CD45 Antigen	9
2.6	Stammzellen aus Nabelschnurblut	10
2.6.1	Vor- und Nachteile von Stammzellen aus NSB	11
2.6.2	Lagerung von NSB	13
2.6.3	Toxizität von DMSO	13
2.6.4	Aufbereitungsverfahren von Nabelschnurblut	14
2.7	Zielsetzung dieser Arbeit	15
3.	Materialien und Untersuchungsmethoden	16
3.1	Stammzellpräparation	17
3.1.1	Separationsverfahren	18
3.1.1.1	Rubinsteinverfahren	18
3.1.1.2	Sepax ohne HES	19
3.1.1.3	Sepax mit HES	22
3.1.2	Kryokonservierung	22
3.2	Qualitätssicherung	23
3.2.1	Bestimmung von blutbildenden Einheiten (CFU = Colony Forming Units)	23

3.2.2	Bestimmung der Stammzellen	24
3.2.2.1	Funktionsbeschreibung eines Durchflusszytometers	24
3.2.2.2	Nachweis der CD34+ Zellen am Durchflußzytometer	26
3.2.2.3	MNC Bestimmung	28
3.2.3	Blutbildbestimmung am Blutzellzählgerät	28
3.3	Statistische Auswertungsverfahren	28
4.	Ergebnisse	30
4.1	Ergebnisse der Präparation	30
4.1.1	Wertevergleich absoluter Zellzahlen im Konzentrat der Verfahren mit 60 ml	30
4.1.2	Wertevergleich absoluter Zellzahlen im Konzentrat der Verfahren mit 95 ml	35
4.1.3	Zellausbeuten der Verfahren mit 60 ml	39
4.1.4	Zellausbeuten der Verfahren mit 95 ml	42
4.2	Verfahrensvergleich	44
4.2.1	Vergleich von Rubinstein 60 ml mit Rubinstein 95 ml	44
4.2.2	Vergleich von Sepax ohne HES 60 ml mit Sepax ohne HES 95 ml	45
4.2.3	Vergleich von Sepax mit HES 60 ml mit Sepax mit HES 95 ml	46
5.	Diskussion	47
6.	Literaturverzeichnis	53
7.	Abkürzungsverzeichnis	66
8.	Danksagung	68
9.	Lebenslauf	69

1. Zusammenfassung

Hintergrund und Ziele: Die Gewinnung und Transplantation von Stamm- und Vorläuferzellen aus peripherem Blut zur Rekonstitution der Hämatopoese bei Patienten, die mittels einer Hochdosis-Chemo-/Radiotherapie behandelt wurden, wird seit vielen Jahren durchgeführt. Dies erfordert eine stetige Verbesserung der Transplantate. In der vorliegenden Arbeit wird ein Vergleich von 3 verschiedenen Präparationsverfahren zur Anreicherung hämatopoetischer Stammzellen bei gleichem Ausgangsvolumen im Hinblick auf die Transplantatqualität dargestellt. **Methoden:** Aus 20 Vollblutspenden wurden jeweils drei 60 ml und drei 95 ml Einheiten entnommen. Je eine 60 ml und eine 95 ml Einheit wurden in einem Zweizyklus-Sepaxverfahren zum Einen mit HES, zum Anderen ohne HES aufbereitet. Die dritte 60 ml und 95 ml Einheit wurde nach dem bekannten Rubinsteinverfahren aufbereitet und im Vergleich zu den o.g. Verfahren auf WBCs, ERYs, THR, MNCs, CFUs, CD34 positive Zellen, vitale CD34 positive Zellen und vitale Leukozyten untersucht.

Ergebnisse und Beobachtungen: Das Zweizyklus-Sepaxverfahren ohne HES zeigte in beiden Ausgangsvolumina die größten Ausbeuten im Hinblick auf WBCs mit $96,10 \pm 24,55$ % (Zweizyklus-Sepaxverfahren mit HES $84,96 \pm 9,78$ %, Rubinsteinverfahren $77,91 \pm 12,75$ %), MNCs, CD34+ Zellen, vitale CD34+ Zellen, vitalen Leukozyten und den CD34+ Zellen aus 45/34. Beide Sepax-Verfahren erzielten höhere Ausbeuten an kernhaltigen Zellen. Das Rubinsteinverfahren wiederum wies die geringste Beimengung von unerwünschten Blutbestandteilen (ERY, THR) auf.

Praktische Schlussfolgerungen: Beide Zweizyklus-Sepaxverfahren erzielten deutlich bessere Ausbeuten an WBCs, MNCs und CD34+ Zellen als das Rubinsteinverfahren. Die Reduktion der ERYs ist effektiver, wenn HES hinzugefügt wurde. Es besteht zudem beim Sepaxverfahren eine geringere Kontaminationsgefahr und die Möglichkeit eines standardisierten Ablaufes mit z.T. erheblich kürzerer Präparationszeit.

Summary

Background: Peripheral blood stem cells are increasingly used and transplanted to reconstitute haematopoiesis after high-dose chemoradio therapy. That means that transplants have to be better during time. Therefore we compared three different preparation techniques, using the same volume, to compare the quality of the transplant after concentration of haematopoietic stem cells.

Study design and Methods: Twenty whole blood units from donors were respectively split into 60 ml and 95 ml unit which was processed either using a two-cycle Sepax procedure with HES as a sedimentation agent, or without HES. The third unit of the same size was processed with a

manual separation procedure of Rubinstein. The collection efficiency of WBCs, ERYs, THRs, MNCs, CFUs, CD34 Procount, vital CD34, vital Leukocytes and CD34 from 45/34 were analysed. **Results:** The two-cycle Sepax procedure without HES obtained the highest WBCs with $96,10 \pm 24,55$ % (two-cycle Sepax procedure with HES $84,96 \pm 9,78$ %, procedure of Rubinsteinverfahren $77,91 \pm 12,75$ %), MNCs, CD34+ cells, vital CD34+ cells, vital Leukocyte and CD34+ cells from 45/34. Both Sepax procedures reached greater amount of nucleated cells. The procedure of Rubinstein otherwise showed lower admixtures of undesired blood components (ERY, THR). **Conclusion:**

Performing both two-cycle Sepax procedure the collection efficiencies for WBCs, MNCs and CD34+ cells are superior to those of the Rubinstein procedure. The ERY reduction is more effective when HES is added. Moreover the advantage of the Sepax procedure is a less risk of contamination, a standardized processing procedure and a significantly shorter processing time.

2. Einleitung

2.1 Hochdosis Chemotherapie und Transplantation hämatopoetischer Stammzellen

In den letzten Jahrzehnten hat die Behandlung von hämatologischen Malignomen und soliden Tumoren durch eine Hochdosischemo-/Radiotherapie deutlich an Bedeutung zugenommen [49, 79]. Diese Hochdosischemo-/Radiotherapie ist mit einer ausgeprägten Hämatotoxizität (Myelosuppression) verbunden, die mit besonderen Risiken, wie Infektionen, Blutungen und durch die Toxizität der Hochdosischemo- Radiotherapie selbst, für den Patienten potentiell sehr gefährlich ist und letal enden kann. Um die Rekonstitution der Hämatopoese zu beschleunigen, werden dem Patienten im Anschluss an die Hochdosischemo-/Radiotherapie hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks oder des peripheren Blutes transplantiert [34, 40, 57, 64]. In der Vergangenheit hat sich bei der Art und Weise der Transplantation ein Wandel vollzogen. Kamen bis Ende der achtziger Jahre noch überwiegend hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark zur Anwendung, hat sich seit Anfang der neunziger Jahre die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen aus dem peripheren Blut, sowohl vom Patienten selbst (autolog) als auch von Spendern (allogen), durchgesetzt. Seit dieser Zeit steht die Transplantation autologer und allogener Stammzellen, die mittels Leukozytapherese aus peripherem Blut gewonnen werden, im Focus des Interesses. Die dabei intravenös verabreichten

Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks oder des peripheren Blutes gelangen aus dem Blutkreislauf in das Knochenmark des Patienten, nisten sich dort ein und führen zur Regeneration der Hämatopoese [23, 49]. An dem Tag, an dem Blutwerte mit Leukozyten $> 1.000/\mu\text{l}$, Granulozyten $> 500/\mu\text{l}$ und Thrombozyten $> 20.000/\mu\text{l}$ erreicht werden und über dieses Niveau ansteigen, spricht man vom Angehen des Transplantats ("Engraftment"). Dabei wird der Transplantationstag als Tag 0 bezeichnet.

2.2 Formen der Transplantation

2.2.1 Allogene Knochenmarkstransplantation

Die ersten Versuche, die Überlebenschancen von Patienten mit Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, in diesem Fall mit therapierefraktärer akuter Leukämie, durch eine allogene Knochenmarkstransplantation (KMT) zu verbessern, wurden Ende der fünfziger Jahre ohne Kenntnis des humanen Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) vorgenommen und hatten Mortalitätsraten von über 70%. Nach der Entdeckung des humanen MHC Ende der sechziger Jahre wurde die Histokompatibilitätstestung eingeführt. Sie bildet die genetische Voraussetzung einer Transplantation und schränkt ihre Komplikationsrate ein [24, 25, 26].

Die transplantationsbegleitende Mortalität bleibt ein Hauptproblem und bewegt sich, in Abhängigkeit von Alter, Status und Konditionierungsregime, zwischen 5% und 20%. Die Hauptkomplikation der allogenen KMT besteht in der „Graft-versus-host disease“ (GVHD). Sie entsteht bei Histoinkompatibilität zwischen Spender und Empfänger und resultiert daraus, dass transplantierte T-Lymphozyten Antigene des Empfängergewebes als "fremd" erkennen und entsprechend immunologische Abwehrreaktionen einleiten [29]. Die Übereinstimmung der HLA (human leukocyte antigen) Antigene (HLA-A, HLA-B, HLA-C und HLA-DR) ist heute die immunologische Grundlage für die Auswahl eines geeigneten Spenders. Dieser kann unter optimalen Bedingungen vollständig mit dem Spender übereinstimmen, wie bei eineiigen Zwillingen, oder vom Patienten genetisch different sein. Nach den Mendel'schen Vererbungsgesetzen werden die HLA-Merkmale kodominant vererbt, das heißt, die Wahrscheinlichkeit eines HLA-kompatiblen Spender in der Familie besteht für jeden Patient nur zu maximal 25% [29].

Eine ABO-Inkompatibilität stellt keine absolute Kontraindikation für eine Transplantation dar, wenn bei Majorinkompatibilität eine Erythrozytendepletion und bei Minorinkompatibilität eine Plasmareduktion vor der Stammzelltransfusion erfolgt.

Für eine erfolgreiche KMT darf der Spender zumindest keine Erkrankungen des blutbildenden Systems haben und muss gesund und narkosefähig sein. Das bedeutet, dass der Spender frei von relevanten übertragbaren Erkrankungen sein muss bzw. nicht an einer floriden Infektion leiden darf. Die KM-Entnahme birgt zum Einen die Gefahren der Narkose und zum Anderen die Komplikationen bei der Punktion der verschiedenen Stellen des Beckenkammes wie Infektion und Blutungsgefahren [29]. Des Weiteren darf der Spender nicht an einer Knochenmarksfibrose erkrankt sein oder Beckenbestrahlungen erhalten haben [59].

Da mehr als 70% der Patienten keinen HLA-kompatiblen Spender besitzen und in den letzten Jahren die Familiengröße und damit auch die Anzahl der Geschwister zurückgegangen ist, mussten für diese Patienten Alternativen entwickelt werden, um sie mit demselben intensiven, myelosuppressiven Konditionierungsregime behandeln zu können. Eine Strategie prüft beispielsweise den Einsatz von HLA-haploidentischen Familienmitgliedern oder HLA-identischen Nicht-Verwandten. Sofern ein solcher Spender nicht existiert, greift als Standardbehandlung die Reinfusion des dem Patienten in Remission und vor supralethaler Therapie entnommenen KM als autologe KMT.

2.2.2 Autologe Knochenmarkstransplantation

Seit Anfang der achtziger Jahre rückte die autologe Knochenmarkstransplantation deutlich in den Mittelpunkt des Interesses [53]. Das Problem der Spenderverfügbarkeit und der immunologischen Risiken einer allogene Transplantation, wie akute und chronische GVHD, wird durch die autologe Transplantation umgangen. Dadurch konnte die peritransplantäre Morbidität und Mortalität verringert und die Hospitalisierungsdauer signifikant verkürzt werden [47].

Das Prinzip der autologen KMT besteht darin, die hämatopoetischen Stammzellen des Patienten vor dem Einfluss der myelosuppressiven Hochdosischemo-/Radiotherapie zu schützen. Dazu werden dem Patienten vor der Konditionierungsbehandlung die Stammzellen entnommen und nach Abschluss der Behandlung wieder reinfundiert [29]. Der Verlauf der autologen KMT birgt meist weniger Komplikationen als der der allogene KMT. Allerdings konnten Kersey et al für

Leukämie-Patienten zeigen, dass die Rezidivrate nach autologer KMT im Vergleich zur allogenen KMT erhöht ist [47]. Erklärt wird das durch das Ausbleiben der Graft-versus-Leukämie-Reaktion (GvLR). Die potentielle Rückübertragung von malignen Zellen bei hämatologischen Erkrankungen sowie bei medullär metastasierenden soliden Tumoren stellt ebenfalls ein Problem dar. Diese verbliebenen neoplastischen Zellen proliferieren möglicherweise und führen zum Rezidiv [59]. Unter dem Begriff des “Purging“ versteht man Verfahren, die das autologe Knochenmark vor Reinfusion von den verbliebenen Tumorzellen ex vivo reinigt. Als Beispiele seien hier zum Einen das Chemopurging mit Metaboliten des Cyclophosphamid [43], zum Anderen das Immunopurging mit Antikörpern oder kombinierten Methoden, z.B. das Immunmagnetverfahren [42, 55], die gegen Membranantigene von malignen Zellen gerichtet sind, erwähnt. An die einzelnen Purging-Methoden ergeht allerdings die Anforderung, eine effiziente und selektive Depletion der malignen Zielpopulation ohne eine signifikante Reduktion der hämatopoetischen Vorläuferzellen zu erzielen. Diese Anforderung konnten sie bislang aber nicht erfüllen.

2.2.3 Blutstammzelltransplantation im Vergleich zu Knochenmarkstransplantation

Die Möglichkeit Stamm- und Vorläuferzellen aus peripherem Blut anstatt aus Knochenmark zu entnehmen, offenbarte einen wesentlichen Therapiefortschritt für die Behandlung von hämatopoetischen Erkrankungen und soliden Tumoren. Seit Mitte der neunziger Jahre haben die Blutstammzellen bei der autologen Transplantation das KM nahezu ersetzt. Zunehmend werden nun auch von verwandten als auch von nicht verwandten Spendern periphere Blutstammzellen für die allogenen Transplantationen verwendet.

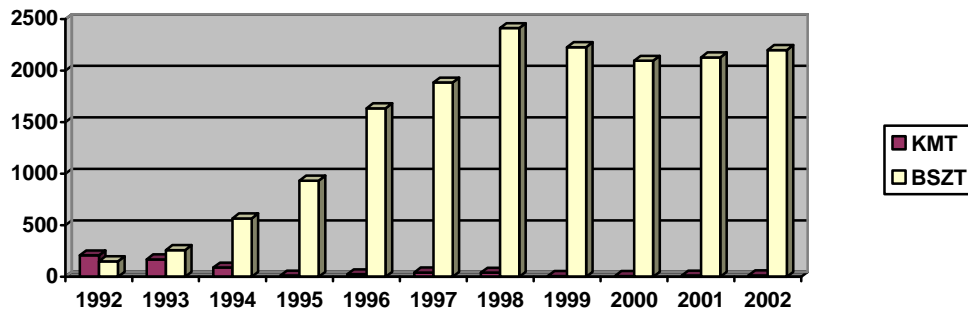


Abb.1 Anzahl autologer Transplantationen pro Jahr in Deutschland (Quelle: Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark – und Blutstammzelltransplantationen e.V. (DAG-KBT), Deutsches Register für Stammzelltransplantation (DRST))
 KMT = Knochenmarktransplantation
 BSZT = Blutstammzelltransplantation

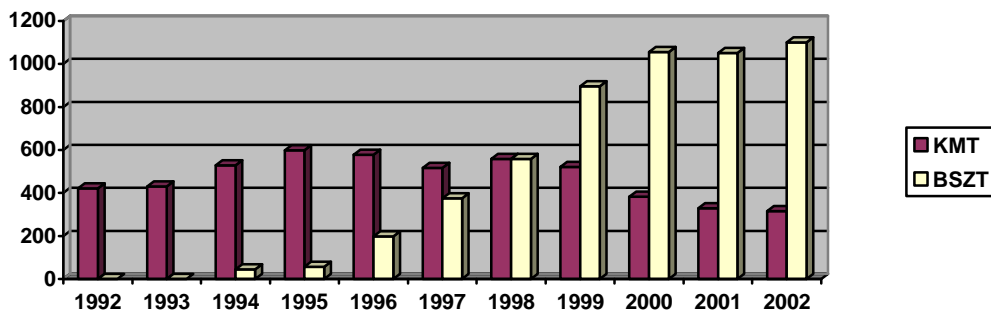


Abb.2 Anzahl allogener Transplantationen pro Jahr in Deutschland (Quelle: Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark – und Blutstammzelltransplantationen e.V. (DAG-KBT), Deutsches Register für Stammzelltransplantation (DRST))
 KMT = Knochenmarktransplantation
 BSZT = Blutstammzelltransplantation

Dabei betrug der Anteil an Fremdspendern 1999 in Deutschland über 50% bei den allogenen Transplantationen.

Blutstammzelltransplantationen bieten gegenüber KMT sowohl ökonomische als auch medizinische Vorteile für Spender und Patienten. So kann auch bei Patienten mit Knochenmarksfibrose oder nach Beckenbestrahlung eine Entnahme vorgenommen werden. Die Entdeckung, dass Wachstumsfaktoren Blutstammzellen in großen Mengen mobilisieren, welche in Zytaphereseverfahren gewonnen werden können, eröffnete neue Perspektiven in der Transplantation hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen. Blutstammzellen sind im Vergleich zum KM einfacher und risikoärmer zu gewinnen, bieten eine höhere Vorläuferzellzahl, führen zu einer raschen hämatologischen und immunologischen Rekonstitution nach Transplantation und erleichtern neue Behandlungsstrategien mit in-vitro-

Manipulation des Transplantates. Tabelle 1 stellt die Vorteile für Spender und Empfänger von peripheren Blutstammzellen gegenüber Knochenmark dar.

Vorteile von peripheren Blutstammzellen gegenüber Knochenmark

Spender	Empfänger
Ambulante Entnahme	Schnellere hämatologische und immunologische Rekonstitution
Keine Vollnarkose	Geringerer Bedarf an Antibiotika und Blutprodukten
Geringeres Risiko	Geringere Morbidität
Höhere Stammzellzahl	Kürzere Hospitalisation
Bessere Manipulation (Selektion, Stimulation, Expansion, Gentransfer)	Geringere Mortalität (?)

Tabelle 1

2.3 Mobilisierung autologer Stammzellen aus dem Knochenmark

Mit dem Beginn von zytostatischen Chemotherapien wurden parallel dazu Auswirkungen auf das blutbildende System festgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass sich positive Effekte auf die Anzahl der zirkulierenden Blutstammzellen nach einer zytostatische Chemotherapie auswirkten [1, 56, 73, 80].

Ein Meilenstein für die Mobilisation von Blutstamm- und Vorläuferzellen war Ende der achtziger Jahre die Entdeckung der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (Zytokine) [41, 84, 89]. Der Granulozyten koloniestimulierende Faktor (G-CSF) und der Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierende Faktor (GM-CSF) besitzen die Fähigkeit die Zahl der CD34+ Zellen des

peripheren Blutes um das 20- bis 100-fache zu steigern [14, 16, 21, 44, 63, 78]. Die Gabe von G-CSF ist jedoch nicht völlig frei von Nebenwirkungen. Neben Grippe-ähnlichen Symptomen trat bei einigen gesunden Spendern eine sonographisch nachweisbare Vergrößerung der Milz auf, die in einigen Fällen sogar zur Milzruptur führte [11, 33]. Ein mobilisierender Effekt auf zirkulierende Stammzellen durch zytostatische Chemotherapeutika bei Patienten, die an soliden Tumoren erkrankt waren, wurde erstmals von Richman et al. beschrieben [65]. Dabei ergab sich eine 20-fache Erhöhung der CFU-GM (Colony-forming units granulocyte-macrophage) im peripheren Blut.

Studien haben gezeigt, dass die Zahl der zirkulierenden Blutstammzellen um den Faktor 1.000 gesteigert werden können, wenn man zytostatische Chemotherapie mit der Gabe von Wachstumsfaktoren kombiniert [37]. Diese Kombination darf allerdings nur bei Patienten vorgenommen werden, bei gesunden Spendern verbietet sich die Gabe von Zytostatika.

2.4 Das CD34 Antigen

CD34 ist ein Oberflächenmarker, der sich auf hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen findet. CD34 positive Zellen sind sowohl für die Hämatopoese als auch für die Rekonstruktion des KM nach Schädigung, als auch für die Entwicklung von verschiedenen Zelltypen der Blutbildung mit verantwortlich [5, 22]. Unter Ruhebedingungen sind etwa 1-4% der kernhaltigen Zellen im KM, jedoch nur 0,01-0,04% der Leukozyten des peripheren Blutes CD34-positiv (CD34+). Die durchflusszytometrische Bestimmung von CD34+ Zellen gehört heutzutage zur Routinediagnostik [13, 70].

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass etwa 100 solcher hochgereinigter Zellen zur kompletten Rekonstruktion der Hämatopoese führten [72].

2.5 Das CD45 Antigen

CD45 ist ein Pan-Leukozytenmarker und wird reifungsabhängig reguliert. Stammzellen bzw. CD34+ hämatopoetische Vorläuferzellen exprimieren das CD45-Antigen nur in geringen Mengen, gefolgt von Monozyten und Granulozyten. Thrombo- und Erythrozyten sind CD45-negativ. Damit dient die CD45 Gegenfärbung zur Detektion der Leukozyten und Elimination der für die Durchflusszytometrie störenden Erythrozyten und Thrombozyten. Eine Kombination der Marker CD45 und CD34 ist zum Nachweis der schwachen CD34-Antigene am Besten geeignet, da CD45 mit zunehmender Reife stärker auf der Leukozytenoberfläche exprimiert wird. Durch das Vorgehen, nur CD34+ Zellen in das Messergebnis zu übernehmen, die CD45 schwach exprimieren, werden somit möglichst unreife Leukozyten beschrieben, die am ehesten Vorläufer- oder Stammzellen sein könnten.

2.6 Stammzellen aus Nabelschnurblut

Während der fetalen Entwicklung wandert die Hämatopoese von der Leber ins Knochenmark. Daher enthält zum Zeitpunkt der Geburt das Nabelschnurblut (NSB) einen hohen Anteil an Stammzellen. Seit einigen Jahren wird dieses Blut als Quelle für Stammzelltransplantationen gesammelt und aufbereitet.

NSB kann bei allen Neugeborenen gewonnen werden. Dabei werden die Nabelschnurgefäße grundsätzlich nach Abnabelung unter sterilen Bedingungen punktiert. Das gewonnene NSB wird in spezielle Blutbeutelssysteme übertragen. Studien haben zwar gezeigt, dass ein höherer Anteil an Stammzellen erzielt werden kann, wenn eine frühzeitige Abnabelung stattgefunden hat [58, 85], demgegenüber nimmt aber der Anteil der CD34+ Zellen im Verlauf der Sammlung offensichtlich zu [12]. Grundsätzlich dürfen nur gesunde Schwangere und gesunde Neugeborene zur Spende herangezogen werden. Genetische oder erworbene Erkrankungen, sowie hämatologische, immunologische Erkrankungen und Infektionen sind genauso Ausschlusskriterien wie relevante Fehlbildungen. Komplikationen während der Schwangerschaft oder Geburt oder eine pränatale Dystrophie mit einem Geburtsgewicht unter 1500g führen ebenfalls zum Ausschluss. Entscheidend für die sichere Präparation ist die einwandfreie Entnahme des Blutes aus der Plazenta.

Angaben über bakterielle Kontaminationsraten liegen in der Mehrzahl der Studien zwischen 5% und 20% [4, 9, 30, 36].

2.6.1 Vor- und Nachteile von Stammzellen aus NSB

Seit der ersten erfolgreichen Nabelschnurbluttransplantation (NSBT) 1988 [38] weitete sich die klinische Anwendung aus. Gluckman et al. veröffentlichten die Verläufe von 143 NSBT [39]. In einer Studie von Rubinstein et al. lag die 1-Jahres-Überlebensrate bei 562 Patienten nach Fremdspendertransplantation bei 61% und das Engraftment bei 81% [68].

Eine größere mögliche MHC-Diskrepanz zwischen Spender und Empfänger wurde postuliert, da viele klinische Studien den Schluss nahe legten, dass bei NSBT eine geringere Rate an akuten und chronischen GVHD auftrat als bei allogene KMT [46, 48, 54, 83].

In einer Studie von Rocha et al. [66] konnte gezeigt werden, dass die hämatopoetische Rekonstruktion nach NSBT zwar länger dauert als bei KMT, es aber keinen Unterschied im Hinblick auf die Überlebenszeit der Patienten gab.

Sanz et al. veröffentlichten 2001 eine Studie zu NSBT mit Fremdspendern für erwachsene Patienten mit hämatologischen Erkrankungen. Als Ergebnis konnte festgehalten werden, dass bei fast allen Patienten das Transplantat angegangen war und die Wahrscheinlichkeit für ein 1-jähriges krankheitsfreies Überleben 53% betrug [69].

Tabelle 2 zeigt die wesentlichen Vor- und Nachteile von NSB gegenüber anderen Stammzellquellen, die sich aus der Gewinnung, Aufbereitung, Lagerung, Transplantation und der entsprechenden Fremdspendersuche ergeben.

	Vorteile	Nachteile
Eigenschaften	<ul style="list-style-type: none">▪ Hohes Proliferationspotential▪ Geringe Prävalenz von CMV▪ Geringes GVHD-Risiko	<ul style="list-style-type: none">▪ Geringe Gesamtmenge

Aufbereitung		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Stammzellenreicher - ung/ Kryokonser - vierung erforderlich
Lagerung	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Transplantat vor Konditionierung gesammelt und gesichert 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Langzeitlagerung sehr kostenintensiv
Fremdspendersuche	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ggf. HLA- differente Transplantate einsetzbar ▪ Versorgung ethnischer Minderheiten 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Spender nur einmal verfügbar
Transplantationen	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Transplantat umgehend verfügbar 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Geringe klinische Erfahrung ▪ Längere Aplasiedauer

Tabelle 2 (modifiziert nach Müller-Eckhardt, Kiefel)

Ein Hauptproblem der Nutzung von NSB als Transplantat ist die geringe Gesamtzahl an proliferationsfähigen Stammzellen. Aus medizinischen und ökonomischen Gründen erfolgt in der Regel vor der Kryokonservierung eine Anreicherung von Stammzellen. Durch die Lagerung und die Aufbereitung kann die therapeutisch verfügbare Stammzelldosis, die eine Untergrenze von $1,5 \times 10^7$ NC/kgKG (NC = nucleated cells = kernhaltige Zellen) nicht unterschreiten sollte [8, 10], so weit absinken, dass die Dosis an Stammzellen für eine Transplantation nicht mehr ausreichend ist. Mit der durchschnittlich erreichten Anzahl von etwa 10×10^8 NCs in einem NSB-Stammzelltransplantat können daher vorwiegend pädiatrische Patienten mit geringeren Körpergewichten (KG) transplantiert werden [39, 54, 68, 83].

2.6.2 Die Lagerung von Nabelschnurblut

Die nach der Aufbereitung der Stammzellen notwendige lange Lagerung wird nach Zugabe von Kryokonservans (10% iges DMSO) in der Gasphase über flüssigem Stickstoff durchgeführt. Eine bakterielle Kontamination des NSB während der Aufbereitung kann durch das Arbeiten in einem GMP-konformen Reinraum nahezu ausgeschlossen werden [20].

Aufgrund der oft jahrelangen Lagerung des NSB entstehen erhebliche Kosten. Es bedarf großer Mengen an Kryokonservans, um die NSB überhaupt erst einfriertauglich machen zu können. In der Regel verwendet man hierzu DMSO (Dimethylsulfoxid) in einer Endkonzentration von 5% - 10%. Da die zugegebene Menge an DMSO in einem bestimmten Verhältnis zum Volumen des einzufrierenden NSB steht, kann mit der Reduktion des Volumens des NSB auch das Volumen an DMSO reduziert und somit die Toxizität des DMSO verringert werden. Die NSBs, die in ihrem Volumen reduziert und folglich eine hohe Konzentration an Stammzellen aufweisen, benötigen nun aufgrund ihres geringeren Volumens nicht mehr so viel Platz im mit flüssigem Stickstoff gefüllten Lagerungstank. Das verringert den Verbrauch an flüssigem Stickstoff und den Bedarf an Lagerungstanks und mindert somit erheblich die anfallenden Kosten [68].

2.6.3 Toxizität von DMSO

Die Fähigkeit von DMSO, lebende Gewebe (Membranen) ohne Schädigung zu durchdringen und damit für den Einfrier- und Auftauvorgang haltbar zu machen, brachte DMSO den Rang eines unverzichtbaren Kryokonservans. Allerdings konnte in verschiedensten Untersuchungen gezeigt werden, dass DMSO auch einige unerwünschte Wirkungen mit sich bringt. Bei Erwachsenen und Kindern ist im Vergleich zur Transplantation mit nicht kryokonservierten Transplantationspräparaten neben dem knoblauchartigen Geruch der Atemluft nach Verabreichung ein gesicherter Anstieg unerwünschter Reaktionen wie Kopfschmerz, Übelkeit, Schüttelfrost, Dyspnoe, erniedrigte Herzfrequenz und Hypertonie, vorübergehend zu beobachten, wenn bei der Transplantation die gesamte, zur Kryoprotektion eingesetzte DMSO-Menge mit dem Stammzelltransplantat infundiert wird [17, 27, 74, 76, 77, 81].

Zudem konnte gezeigt werden, dass bei hohen Konzentrationen von DMSO und langen (> 2h) Zeiten für die Präparation von Transplantaten ein zytotoxischer Effekt mit Verlust an vitalen Zellen hinzu kommt. Als mögliche biologische Mechanismen werden u.a. Veränderungen im

Zytoskelett, epigenetische Ereignisse und Cross-linking von nukleären Proteinen diskutiert. Wegen gelegentlichen Auftretens unerwünschter Effekte während der Transfusion wie Hautrötung, Atemnot, Übelkeit, abdominale Krämpfe, Erbrechen, Diarrhoe, lokale Vasospasmen, Hypo- und Hypertension, kardiale und anaphylaktoide Reaktionen, die überwiegend auf die histaminfreisetzende Wirkung von DMSO zurückgeführt werden, sollte die Menge des mit dem Stammzelltransplantat verabreichten DMSO soweit wie möglich reduziert werden [6, 7, 18, 35, 50, 61].

2.6.4 Aufbereitungsverfahren für Nabelschnurblut

Die Aufbereitung des gewonnenen NSB zur Konzentration der Stammzellen und zur Reduktion des Volumens für die Kryokonservierung ist ein wesentlicher Bestandteil für die Erstellung eines NSBT. Dazu stehen bislang verschiedene Verfahren zur Verfügung, die allerdings alle noch nicht standardisiert ablaufen.

In der Literatur finden sich verschiedene Angaben über Sedimentationstechniken mit Hydroxyethylstärke (Hydroxyethyl starch: HES) - und Gelatine-Präparationen oder Dichtegradientenverfahren zur Anreicherung von NSB. Dabei liegt die Ausbeute für NC, CD34+ Zellen und CFUs i.d.R. oberhalb von 80% [3, 15, 51, 52, 60, 86]. Seit einiger Zeit sind auch bereits teilautomatisierte Verfahren in der Erprobung, die auf ein Zeitersparnis in der Präparation und eine Standardisierung des Ablaufes hoffen lassen. Zingsem et al. zeigten in einer Studie von 2003 mit einer teilautomatisierten Separationsmethode mit dem Sepax Geräte, dass trotz einer Zeitersparnis keine signifikante Verbesserung der Qualität der NSB-Transplantate gegenüber dem Standardverfahren nach Rubinstein erreicht werden konnte. Dabei wurde das Sepax Verfahren ohne Zugabe von Sedimentationsbeschleunigern getestet [88].

Bisher konnte zwar kein gesicherter Nachweis einer Verbesserung der NSB-Transplantate gegenüber dem zurzeit geläufigen Verfahren nach Rubinstein gezeigt werden, als Vorteil automatisierter Verfahren wurde aber neben der besseren funktionalen Standardisierung auch das geschlossene System genannt, wodurch das NSB keinerlei Gefahr einer weiteren Kontamination ausgesetzt wird.

In dieser Studie äußert der Autor die Vermutung, dass auch bei der NSB Aufbereitung analog zur Knochenmarkaufbereitung die Zellausbeute im Aufbereitungszyklus gesteigert werden müsste

[87]. Zudem könnten eventuell mehrere Präparationen annähernd zeitgleich ablaufen ohne dass für jedes Präparat Personal anwesend sein müsste.

2.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Gegenstand dieser Arbeit ist ein Vergleich dreier Separationsverfahren bezüglich der Ausbeute an Stammzellen und der Qualität der Transplantate. Die dabei gegenübergestellten Testverfahren sind zum Einen das zur Stammzellseparation etablierte Rubinsteinverfahren, zum Anderen das bereits vorgestellte Sepax Verfahren, bei dem aber in dieser Arbeit das Blut je zweimal prozessiert wurde, sowie ein Verfahren, bei dem Hydroxyäthylstärke (HES) als Sedimentationsbeschleuniger bei der Aufbereitung im Sepax-System eingesetzt wird („Sepax mit der Zugabe von HES“). Des Weiteren sollte überprüft werden, in wie weit das Ausgangsvolumen für die Ausbeute der jeweiligen Verfahren eine Rolle spielt.

3. Materialien und Methoden

Reagenzien:

- 20 Vollblutspenden von gesunden Spendern (Transfusionsmedizinische und Hämatologische Abteilung, Universitätsklinikum Erlangen)
- Aqua dest. (Braun, Melsungen)
- Kryokonservans DMSO 33% in PBS des UK Erlangen
- IMDM-Medium (StemCell Technologies, Vancouver, British Columbia, Kanada)
- Auftaulösung; Dextran 40/Humanalbumin 0,5% (Apotheke Universitätsklinikum Erlangen)
- MethoCult®GF (StemCell Technologies, Vancouver, British Columbia, Kanada)
- FACS Lysing Solution (BD Biosciences, Becton Dickenson, San Jose, CA, USA)
- PharM Lyse™ (BD Biosciences, Becton Dickenson, San Jose, CA, USA)
- FCS (Biochrom AG, Berlin)
- HES: Plasmasteril®, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v. d. H. oder Plasmafusin® HES 450 Infusionslösung, BAXTER Deutschland GmbH, Unterschleißheim

Antikörper (AK) : Angaben zu den Fluoreszenzfarbstoffen zu jedem AK

- Anti-CD34-PE, Phycoerythrin-(PE) markiert (HPCA-2; BD, Biosciences)
- Anti-CD45-FITC, Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) markiert (J143-1270; BD Biosciences)
- Anti-IgG1-PE als Isotypenkontrolle (BD Biosciences)
- 7-Amino-actinomycin D (7-AAD), (BD Biosciences)

Geräte und Verbrauchsartikel:

- Durchflusszytometer (FACSCalibur, BD Biosciences)
- BD TruCount™ Tubes (BD Biosciences)
- CFU Platten; Cellstar (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
- Pipettenspitzen; epT.I.P.S (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg,

Deutschland)

- Zentrifuge; Rotixa 50RS (Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland)
- Sicherheitswerkbank; Hera-Safe® (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland)
- CO2-Brutschrank (Function line, Heraeus Instruments)
- Blutzellanalysator; Sysmex KX-21 (Sysmex, Fa. Toa Medical Electronics Co LTD, Kobe, Japan)
- Vollblutbeutel; Compoflex 150ml Leerbeutel (Fresenius HemoCare, Bad Homburg, Deutschland)
- Zellseparator Sepax S-100 (Biosafe SA, Eysins, Schweiz)
- Sepax-Kit für Zelltrennung CS510 (Biosafe SA, Eysins, Schweiz)
- Doppel-Leerbeutel 200ml (MacoPharma, Tourcoing, Frankreich)
- Mikroskop; Olympus IX50 (Olympus Optical Co GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Einfrierautomat; ARCI-100 Biofreeze (Consarctic GmbH, Schöllkrippen, Deutschland)
- Flüssig-Stickstoff-Vorratstanks, NT25/R und NT50/R (Consarctic GmbH)
- Einfrierkassetten CR205 (Consarctic GmbH)
- Rollklemme
- Vortexer; VortexGenie2 (Scientific Industries, Bohemia, New York, USA)
- Plasmaextraktor (HIS Blutbank- und Labortechnik, Rosendahl, Deutschland)

3.1 Stammzellpräparation

Als Ausgangsmaterial für die Präparation dienten Vollblutkonserven, die nicht länger als 24 Stunden bei Raumtemperatur zwischengelagert waren. Vollblutkonserven gesunder Spender wurden eingesetzt, da NSB-Entnahmen nicht über ein hinreichendes Volumen verfügen, das es ermöglichte, identisches Ausgangsmaterial vergleichend in unterschiedlichen Präparationsverfahren einzusetzen. Die Festlegung der Volumens -gruppen von 60 ml und 95 ml erfolgte, da den Richtlinien der Bundesärztekammer [19] eine Nabelschnurbluteinheit nur dann zur Einlagerung als allogenes Transplantat geeignet ist, wenn das Volumen mindestens 60 ml beträgt. Ein NSB-Entnahmevermögen von 95 ml stellt nach den Beobachtungen in der Stammzellbank der Universitätsklinikums Erlangen den Mittelwert der bezüglich des

Entnahmeverolumens akzeptierten Einheiten dar. Nach gründlichem Durchmischen wurden die Vollblutkonserven in je 3 Portionen à 95 ml und 60 ml aufgeteilt. Aus diesen Portionen wurden mit unterschiedlichen Separationstechniken Leukozytenkonzentrate (Stammzellpräparate) hergestellt, mit den unten genannten Verfahren analysiert, und auf Vitalität untersucht und anschließend kryokonserviert.

3.1.1 Separationsverfahren

In der vorliegenden Arbeit wurden die von Rubinstein et al. beschriebene Zentrifugationstechnik [67] und zwei vergleichend eingesetzte Modifikationen der von Zingsem et al. [88] beschriebenen Separationstechniken im Zellseparator Sepax S-100 verglichen. Je eine Einheit à 95 ml und 60 ml wurde mit jedem der 3 Präparationsverfahren aufbereitet.

3.1.1.1 Rubinsteinverfahren

Blutbestandteilsauftrennung

In diese jeweiligen VB-Portionen wurde 6%-ige HES in einem Verhältnis von 1:5 hinzugefügt. Hierzu transferierten wir HES mittels Spritze steril unter Gewichtskontrolle in den VB-Beutel. Das Doppelleerbeutelssystem wurde in einer Blutbeutelzentrifuge mit 30g für 5 Minuten bei 10°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Beutelsystem mittels eines manuellen Plasmaextraktors in das leukozytenreiche Plasma (LRP) und das Erythrozytenkonzentrat (EK) aufgetrennt. Der Beutel mit dem LRP wurde anschließend in einer zweiten Zentrifugation mit 400g für 10 Minuten bei 10°C zentrifugiert. Mit Hilfe des Plasmaextraktors wurde das leukozytenarme Plasma (LPP) nach Brechen des Ventils nach oben in den dafür vorgesehenen Beutel abgeleitet.

Der LPP-Beutel wurde abgeklemmt. Ein Teil des Überstands diente für die Kryokonservierung als Suspensionsmedium.

Das Leukozytenkonzentrat wurde mit einer 50ml Spritze abgesaugt. Um auch die im LK-Beutel verbliebenen Zellen zurückzugewinnen, wurde dieser Beutel anschließend zweimal mit einer kleinen Menge (3-5ml) LPP gefüllt und durchmischt. Die so gewonnenen Zellen wurden ebenfalls mit der 50ml Spritze abgesaugt. Somit entstand ein leicht verdünntes

Leukozytenkonzentrat (LK), dem jetzt nur noch das Kryokonservans zuzusetzen war. Die beiden Schritte des Nachspülens und Verdünnens mit LPP orientierten sich an dem Ziel eines mittleren Volumens des LKs von 35 ml im Einfrierbeutel vor Zugabe des Kryokonservans. Von dem LK wurde zuletzt 1 ml mit einer Spritze steril abgenommen und für die Qualitätskontrolle (Blutbild, Differentialblutbild, CD34, CFU) verwendet. Somit erhielten wir zum Schluss je eine 1 ml Probe vom LK nach dem Rubinsteinverfahren für 95 ml und 60 ml.

3.1.1.2 Sepax ohne HES

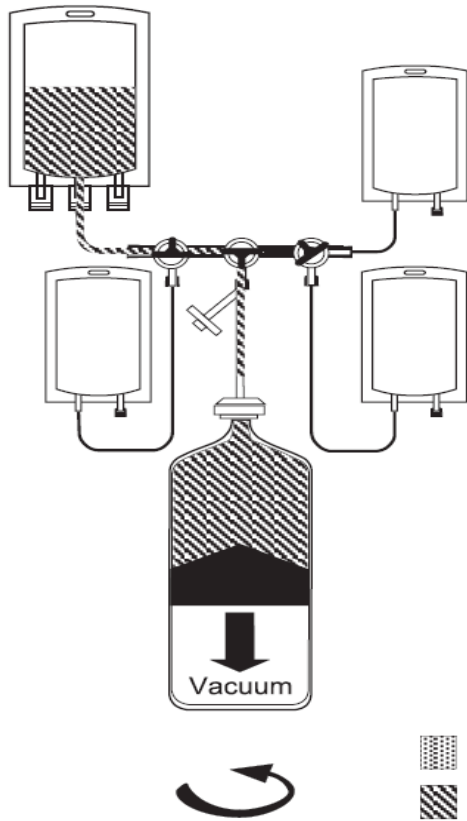
Ausgangsstoffe

Es wurden Blutbeutel, die Bestandteil des funktionell geschlossenen Einmal-Separationssets waren, verwendet. Wir benutzten zur Zellpräparation den Zellseparator Sepax der Firma Biosafe. Zur Anwendung kam das Set CS-510, dessen beide Sammelbeutel auch zur Tiefkühlkonservierung genutzt wurden.

Blutbestandteilsauftrennung

Nach Aufteilung der Beutel entsprechend ihrer Volumina wurden diese über den Einstichdorn mit dem Einmal-Separationsset des Apharesesets verbunden. Die Separation erfolgte computergesteuert in zwei aufeinander folgenden Zyklen.

Nach der Zellseparation wurden der Sammelbeutel, sowie die Beutel, in die das LPP und das EK flossen getrennt und abgeschweißt. Aus dem LK entnahmen wir mit einer Spritze 0,7 – 1,0 ml Probe für Qualitätskontrollen (Blutbild, Differentialblutbild, CD34, CFU). Das gesammelte LK-Volumen lasen wir vom Display ab und überprüften es durch Gewichtsbestimmung auf Plausibilität.

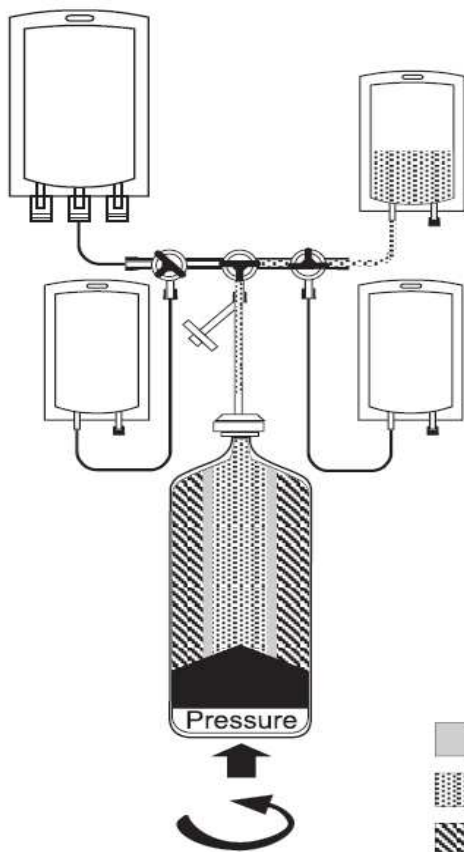


Füllungsphase

Die Position der Absperrhähne bestimmt den Fluss des VB durch das Set in die Separationskammer. Der Entnahmebeutel links oben ist mit VB gefüllte und mit dem einem Einstichdorn an das Sepax-Kit CS 510 angeschlossen.

Abbildung 3 [88]

Plasma
Vollblut

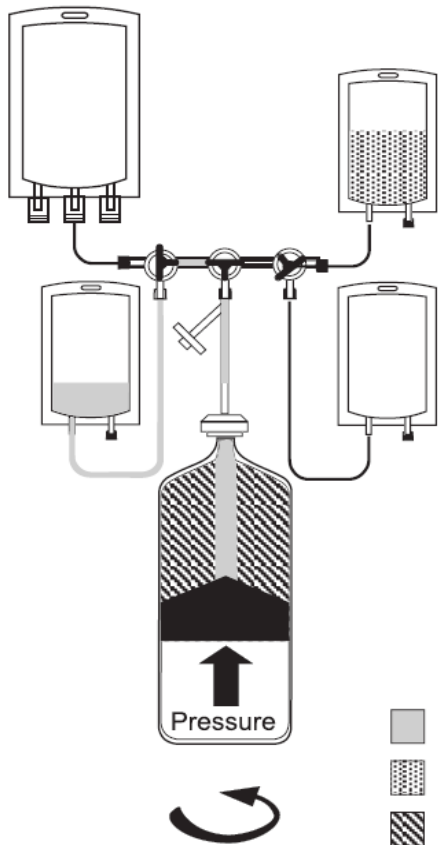


Separationsphase – Plasmaextrahierung

Nach Auftrennung des VB in die Blutbestandteile durch Zentrifugation erfolgt die schrittweise Ableitung der Blutkomponenten. Als erster Teilschritt wird das Plasma abgeleitet (rechter oberer Beutel)

Abbildung 4 [88]

Mononukleären Zellen
Plasma
Vollblut

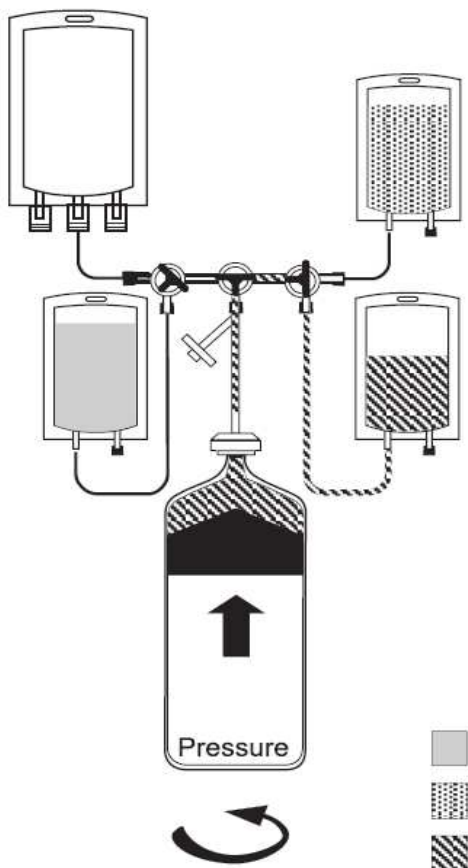


**Separationsphase –
Extrahierung
mononukleärer Zellen**

Als zweiter Teilschritt folgt
nun die Ableitung des
Konzentrates an
mononukleären Zellen in
den linken unteren Beutel.

- Mononukleären Zellen
- Plasma
- ▨ Vollblut

Abbildung 5 [88]



**Separationsphase –
Erythrozytenextrahierung**

Dritter und letzter Teilschritt
der Auftrennung mit
Ableitung des
Erythrozytenkonzentrates in
den rechten unteren Beutel

- Mononukleären Zellen
- Plasma
- ▨ Erythrozyten

Abbildung 6 [88]

3.1.1.3 Sepax mit HES

Die Separation Sepax mit HES erfolgte bis auf die Zugabe von HES analog der Separation Sepax ohne HES.

Blutbestandteilsauftrennung

Nach Aufteilung der Beutel entsprechend ihrer Volumina fügten wir 6%-ige HES in einem Verhältnis von 1:5 hinzu. Hierzu wurde HES mittels Spritze steril unter Gewichtskontrolle in den VB-Beutel transferiert. Anschließend wurde der Beutel mit dem Einstichdorn des Einmal-Separationsset des Apharesesets verbunden. Die Separation erfolgte computergesteuert in zwei aufeinander folgenden Zyklen (analoge graphische Darstellung unter 2.1.1.2).

Nach der Zellseparation wurden die Sammelbeutel analog der Beschreibung der Separation ohne HES getrennt und abgeschweißt. Aus dem LK entnahmen wir mit einer Spritze 0,7 – 1,0 ml Probe für Qualitätskontrollen (Blutbild, Differentialblutbild, CD34, CFU). Das gesammelte LK-Volumen lasen wir vom Display ab und überprüften es durch Gewichtsbestimmung auf Plausibilität.

3.1.2 Kryokonservierung

Auf 4°C gekühltes Kryokonservans (33% DMSO, 67% PBS) wurde auf einem Kühlakku unter ständigem Durchmischen dem Einfrierbeutel mit der Leukozytensuspension langsam zugeführt. Die Kryokonservanslösung wurde dem LK im Verhältnis 1:2 zugegeben, so dass eine DMSO Endkonzentration von 10% resultierte

Anschließend folgte die Aufteilung auf zwei bzw. drei Endproduktbeutel gleichen Volumens. Falls das Endproduktvolumen über 50 ml betrug, wurde das Endprodukt (LK/ DMSO) auf drei Endproduktbeutel aufgeteilt. Ziel war, dass keine Endproduktbeutel mehr als 25 ml Volumen aufwiesen.

Nach Abschluss der Einfrierprozedur wurden die Einfrierkassetten in den Lagertank für Stammzellpräparationen in der Gasphase über Flüssigstickstoff eingelagert.

3.2 Qualitätssicherung

3.2.1 Bestimmung von blutbildenden Einheiten (CFU = Colony Forming Units)

Prinzip der CFU – Testung

Blutzellbildende Stamm- und Vorläuferzellen sind auch in Zellkulturansätzen in der Lage sich zu vermehren und reife Blutzellen zu bilden. Proliferation und Differenzierung geben Auskunft über die Vitalität, Reife und Wachstumsfähigkeit dieser Zellen und können nachgewiesen werden, indem man das Zellwachstum und die Ausdifferenzierung in einer ca. zweiwöchigen Zellkultur untersucht.

Der Test zeigt bei geeigneten Kulturbedingungen das Wachstum von granulozyten- und makrophagenbildenden Zellkolonien (CFU-GM), granulozyten-, erythrozyten-, makrophagen- und megakaryozytenbildenden Zellkolonien (CFU-GEMM) und Erythrozytenkolonien (burst forming units = BFU-E) an. Der Anteil der Vorläuferzellen in einer Blutprobe kann durch die Bestimmung der einzelnen CFUs im Verhältnis zu den in der Kultur gebrachten Leukozyten berechnet werden. Hierbei stellt jede Kolonie eine Vorläuferzelle dar. Der Ansatz kann sowohl aus dem Ausgangsmaterial (Vollblut und Leukozytenkonzentrat) als auch aus aufgetauten Proben durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die CFU Bestimmungen nur qualitativ zur Vitalitätsmessung, also zum Nachweis der Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit der Zellen, durchgeführt.

Testdurchführung

Als Kulturmedium wurde Methocult mit 2%igem fötalem Kälberserum (FCS) in Iscove's Medium verwendet. Wir stellten die Zellen in dem 2%-igen FCS-Medium auf eine Konzentration von 1×10^5 / ml (= 100 Zellen / μ l) ein. 0,3 ml der verdünnten Zellsuspension wurden in 3 ml Methocult aufgenommen und gut gemischt. Von den in Methocult vermischten Zellen wurden je 1,1 ml in sterile Petrischalen (35mm) pipettiert und durch leichtes Rotieren in der Schale verteilt. Eine Schale enthielt also 1×10^4 kernhaltige Zellen. Je 2 dieser kleinen Schalen und eine dritten offene, die mit ca. 3 ml Aqua dest. Gefüllt wurde, wurde in eine große (10 cm) Petrischale gestellt. Die geschlossenen Schalen wurden in den Brutschrank bei 37°C mit 5%-igem CO₂ Anteil bebrütet. Nach 14 Tagen Kulturzeit wurden die Schalen unter einem

inversen Mikroskop ausgewertet. Die Ergebnisse wurden für jede Schale und für jede Population separat protokolliert.

3.2.2 Bestimmung der Stammzellen

3.2.2.1 Funktionsbeschreibung eines Durchflusszytometers

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse der Fluoreszenz – und Streulichteigenschaften von Einzelzellen in Suspension. Mittels spezifischer, fluoreszenzmarkierter, monoklonaler Antikörper können Zellen aufgrund ihrer Oberflächenantigene charakterisiert werden. Somit wird die Unterscheidung von Zellen mit ähnlichen morphologischen Eigenschaften ermöglicht.

Die Durchflusszytometrie quantifiziert mehrere optische Eigenschaften von Zellen mit hoher Durchsatzrate. Die Messgeschwindigkeit beträgt maximal 4000 Zellen pro Sekunde (BD FACScalibur™). Dabei werden suspendierte Zellen durch einen Lichtstrahl (LASER) geführt. Die vorbeigeführten Zellen senden in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Probenverarbeitung charakteristische Lichtsignale aus, die mittels geeigneter Detektoren nachgewiesen werden. Durch Erzeugen einer laminären Strömung sowohl der Trägerflüssigkeit als auch der Messprobe, die sich nicht miteinander vermischen, wird der Abstand direkt aufeinanderfolgender Zellen vergrößert. Somit passieren die Zellen jeweils einzeln den Laserstrahl am Ende der laminären Strömung und werden auch als einzelne Zellen gemessen. Zellaggregate werden durch diesen Vorgang, der auch als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet wird, aufgelöst. Jede Zellart streut entsprechend ihrer Zellmembran, der Art ihrer intrazellulären Bestandteile und ihrer entsprechenden Größe das auftreffende Licht in spezifischer Art und Weise. Dadurch lassen sich zum Einen im Vorwärtsstreulicht (forward light scatter, FSC) die Lichtbeugung und damit die relative Zellgröße zum Anderen im Seitwärtsstreulicht (sideward light scatter, SSC, 90°-Streulicht) durch Lichtbrechung und Reflexion die relative Granularität und Komplexität bestimmen. Zur genauen Differenzierung der einzelnen Zellen werden unterschiedliche monoklonale Antikörper verwendet, die ihrerseits mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind. Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörpern handelt es sich um die Fluoreszenzfarbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Peridin Chlorophyll Protein (PerCP). Diese Farbstoffe werden durch das vom Laser generierte Licht mit der Wellenlänge 488 nm zur Fluoreszenz angeregt. Dabei besitzt FITC ein Emissionsmaximum

bei 519 nm (grünlich), PE ein Emissionsmaximum bei 578 nm (gelblich) und PerCP von 675nm (rötlich) und kann somit von PE deutlich unterschieden werden (siehe Abbildung 7). PerCP ist ein Protein aus dem Photosynthesekomplex der Dinoflagellate Glenodinium. Das emittierte Licht wird im Kanal für die 3. Fluoreszenz (FL3) detektiert. Dabei ist das emittierte Fluoreszenzlicht direkt proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle.

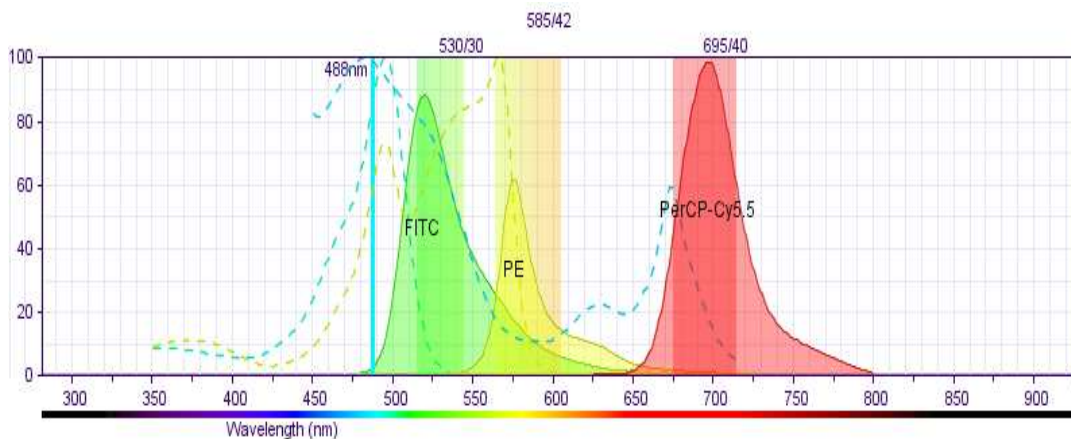


Abb. 7 BD Fluorescence Spectrum Viewer für FITC, PE und PerCP

Des Weiteren verwendeten wir für bestimmte Messungen den Farbstoff 7-AAD (7-Aminoactinomycin). Es ist ein fluoreszierender Zellfarbstoff, der von Licht der Wellenlänge 488nm angeregt wird und Licht mit einem Emissionsmaximum von 647nm emittiert. Eine Besonderheit von 7-AAD ist, dass es ausschließlich die DNA von toten Zellen färbt, da es nur in Zellen ohne intakte Zellmembran eindringen kann. Man bezeichnet 7-AAD daher auch als Avitalfarbstoff. Beim Zelltod kommt es zu einem Verlust des Aufbaus der Zellmembran und somit zur positiven Färbung, wo hingegen intakte Zellen auf die Färbungen negativ reagieren.

Zur Darstellung der Zellanalysen bedarf es zweier optischer Systeme. Die Anregungsoptik besteht aus einem luftgekühlten Argon-Laser (488nm) und Prismen, um den Laserstrahl zu formen und fokussieren. Die Detektionsoptik besteht aus einer Sammellinse, die das emittierte Licht in einem Winkel von 90° sammelt, und einem System von optischen Teiler-Spiegeln und Filtern. Durch die Anregungsoptik werden die einzelnen Zellen ideal ausgeleuchtet und mit Hilfe der Detektionsoptik die emittierten Lichtsignale zu den spezifischen Detektoren geleitet. Die Elektronik wandelt anschließend die gemessenen Spannungspulse in digitale Daten um, die in Form eines Punktwolkendiagramms (DotPlot) dargestellt werden.

3.2.2.2 Nachweis der CD34+ Zellen am Durchflusszytometer

Eine immunologische Differenzierung kann durch den Nachweis des CD34-Antigens erfolgen, welches auf unreifen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Die Durchflußzytometrie macht sich die Expression des CD34-Antigens zunutze, welches mit fluorochrommarkierten monoklonalen CD34-Antikörpern nachgewiesen werden kann. Allerdings ist dieses Antigen nicht nur auf Stammzellen zu finden, sondern auch auf den determinierten Vorläuferzellen, so dass diese Nachweismethode nicht streng stammzellspezifisch ist. Stammzellen werden daher nicht nur aufgrund ihrer CD34-Expression charakterisiert, sondern durch das typische Expressionsmuster des CD45-Antigens. Die Durchflußzytometrie erlaubt zudem eine grobe morphologische Klassifikation von Zellen auf der Basis des Scatterdiagramms FSC gegen SSC.

CD34 – ProCount

Zur Messung der CD34+ Zellen mit dem ProCount System wurden sterile Proben aus dem VK und dem LK nach sorgfältigem Durchmischen entnommen. Die Auswertung erfolgte am Durchflusszytometer als Bestimmung des Anteils an Zellen, die den Oberflächenmarker CD34 exprimierten. Die Untersuchung wurde mittels des ProCount™-Sets zur quantitativen Bestimmung von Progenitorzellen durchgeführt.

Untersuchungsdurchführung

Pro Probe wurden 2 Messröhrchen verwendet. Eines der beiden Röhrchen diente der Messung, das andere Röhrchen der Kontrollmessung. In die Messröhrchen wurden je 20µl Nukleinsäurefarbstoff-, Anti-CD34 PE-, Anti-CD45 PerCP - Gemisch, in die Kontrollröhrchen je 20µl Nukleinsäurefarbstoff-, Anti-IgG1 PE-, Anti-CD45 PerCP - Gemisch pipettiert. In die zwei zusammengehörigen Mess- und Kontrollröhrchen wurden anschließend 50µl des LK hinzu gegeben.

Nach 15 minütiger Inkubationszeit wurden 450µl FACS Lysing Solution (1:10 mit Aqua dest. verdünnt) zur Hämolyse der kontaminierenden Erythrozyten hinzu gegeben. Anschließend erfolgt nach erneuter 30ig minütiger Inkubationszeit die Analyse am Durchflusszytometer, in der die CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen in % aller kernhaltigen Zellen angegeben wurden.

CD34 Messung nach dem ISHAGE - Protokoll

Die CD34 Messung nach dem ISHAGE – Protokoll (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) wird mittels CellQuest analysiert. Die Datenauswertung erfolgte am Durchflusszytometer als Bestimmung des Anteils an lebenden Zellen, die den Oberflächenmarker CD34 exprimierten. Die Untersuchung dient der quantitativen Bestimmung von lebenden und toten Stammzellen.

Untersuchungsdurchführung

Pro Probe wurden 2 Messröhrchen verwendet. Eines der beiden Röhrchen diente der Messung, das andere Röhrchen der Kontrollmessung. In die Messröhrchen wurden je 20µl CD45FITC/CD34PE Gemisch und 5µl 7-AAD, in die Kontrollröhrchen je 10µl CD45FITC, 10µl Maus IgG PE und 5µl 7-AAD pipettiert. In die zwei zusammengehörigen Mess- und Kontrollröhrchen wurden anschließend 50µl der jeweils zu untersuchenden Probe hinzu gegeben. Nach 15 minütiger Inkubationszeit wurde in jedes Röhrchen 1ml PharM Lyse (1:10 mit Aqua dest. verdünnt) gegeben und diese 3-5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels des Programms CellQuest.

3.2.2.3 MNC Bestimmung

Die Bestimmung der MNC Population (Mononukläre Zellen) erfolgte ebenfalls durchflusszytometrisch anhand der Daten der ProCount Messungen. Somit waren keine gesonderten Messvorgänge notwendig. Die Population der MNCs besteht dabei aus den gemessenen Lymphozyten und Monozyten.

3.2.3 Blutbildbestimmung am Blutzellzählgerät

Zur Qualitätskontrolle der erstellten Proben nach den drei verschiedenen Verfahren Rubinstein, Sepax ohne HES und Sepax mit HES wurden die jeweils zu untersuchenden Proben an einem Blutzellanalysator (Sysmex KX-21) gemessen. Die einzelnen Proben wurden bei Raumtemperatur gründlich durchmischt und anschließend durch das Gerät analysiert. Von den insgesamt 18 Parametern waren die Konzentration an Leukozyten (WBC), Erythrozyten (RBC) und Thrombozyten (THR) für diese Arbeit von Bedeutung.

3.3 Statistischen Auswertverfahren

Sowohl aus den Ausgangsportionen, als auch aus jedem Produkt wurden das Volumen, die Konzentrationen an Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, CFUs, MNCs, CD34+ Zellen aus der ProCount Messung, vitale CD34+ Zellen, vitale Leukozyten und die CD34+ Zellen aus der Messung 45/34 bestimmt.

Aus diesen Werten ermittelten wir im nächsten Schritt die Absolutzahlen der einzelnen Zellpopulationen nach der Formel

Konzentration * Volumen = Absolutzahl des zu berechnenden Wertes

Somit entstanden die Absolutzahlen aller Zellpopulationen für das Vollblut (VB) und für die Konzentrate, die mit den zu vergleichenden Techniken hergestellt wurden, also dem Rubinsteinverfahren mit 60 ml Ausgangsvolumen (R60) und mit 95 ml Ausgangsvolumen (R95), dem Sepax Verfahren ohne HES mit 60 ml Ausgangsvolumen (S60) und mit 95 ml Ausgangsvolumen (S95), sowie dem Sepax Verfahren mit HES mit 60 ml Ausgangsvolumen (H60) und mit 95 ml Ausgangsvolumen (H95).

Zur Berechnung der Ausbeuten der jeweiligen Verfahren dienten im darauf folgenden Schritt die Absolutzahlen der Verfahren und die Absolutzahlen des Ausgangsmaterials (VB). Die Ausbeute wurde nach der Formel

$100 \times \text{Absolutzahlen Produkt} / \text{Absolutzahlen Ausgangsmaterial} = \text{Ausbeute in \%}$

berechnet.

Die statistische Auswertung wurde mit dem Computerprogramm SPSS Version 13.0 durchgeführt. Alle Parameter wurden zunächst mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov und des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung überprüft. Beim Vergleich zweier nicht normalverteilter Werte oder eines normalverteilten mit einem nicht normalverteilten Wert wurde der Wilcoxon-Rangsummen-Test, bei dem Vergleich zweier normalverteilter Werte der T-Test für gepaarte Stichproben verwendet.

Ferner wurde für die nicht normalverteilten Werte die jeweiligen Maxima, Minima, Mittelwerte, der Median und die Standardabweichung für alle gültigen Daten erhoben und in Tabellen zusammengestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Präparation

4.1.1 Wertevergleich absoluter Zellzahlen im Konzentrat der Verfahren mit 60 ml

Bei kleinen Ausgangsvolumina (60 ml) waren die absoluten Zellzahlen in den mit dem Sepax Verfahren ohne HES mit 60 ml (S60) aufbereiteten Produkten bezüglich der Leukozyten (WBC), der Erythrozyten (ERY), der Thrombozyten (THR), der mononukleären Zellen (MNC), der CD34-positiven Zellen (CD34+ Zellen), der vitalen Leukozyten und der vitalen CD34+ Zellen höher, als in den mit dem Rubinsteinverfahren (R60) aufbereiteten Produkten. In beiden Aufbereitungsgruppen fanden sich koloniebildende Zellen (CFU). In Tabelle 3 sind die Absolutzahlen der Produkte beider Verfahren gegenübergestellt. (W-Test = Wilcoxon – Test)

	R60	S60	Signifikanz	
	MW ± SD	MW ± SD	T-Test	W-Test
WBC x 10 ⁸	2,22 ± 0,63	2,69 ± 0,65	0,01	
ERY x 10 ⁹	62,66 ± 35,02	159,34 ± 29,65		0,00
THR x 10 ³	5,82 ± 1,65	8,30 ± 4,66		0,00
CFU x 10 ⁴	16,89 ± 13,23	15,43 ± 13,16		0,62
MNC x 10 ⁸	0,96 ± 0,43	1,23 ± 0,39		0,02
CD34 x 10 ⁶	74,33 ± 50,12	120,49 ± 94,03		0,00
Procount				
Vitale CD34 x 10 ³	59,07 ± 39,84	97,85 ± 98,25		0,00
Vitale Leukozyten	2,03 ± 0,62	2,50 ± 0,70	0,01	
CD34 aus 45/34	78,58 ± 45,96	111,37 ± 101,36		0,04

Tabelle 3 Wertevergleich der Absolutzahlen zwischen R60 und S60

Bei dem Vergleich der absoluten Zellzahlen zwischen dem Rubinsteinverfahren mit 60 ml Ausgangsvolumen (R60) und Sepax mit HES mit 60 ml Ausgangsvolumen (H60) zeigte das H60 Verfahren signifikant höhere Werte bei ERY und CD34 Procount. Nicht signifikant größere Ausbeuten wurden dagegen bei WBC, MNC, vitale CD34 und CD34 aus 45/34 erzielt. Unter den vitalen Leukozyten konnten nahezu identische Absolutzahlen erhoben werden. In beiden Aufbereitungsgruppen fanden sich hingegen nicht signifikant größere Werte für THRs und CFUs (siehe Tabelle 4).

	R60	H60	Signifikanz	
	MW ± SD	MW ± SD	T-Test	Wilcoxon -Test
WBC x 10 ⁸	2,22 ± 0,63	2,32 ± 0,64	0,60	
ERY x 10 ⁹	62,66 ± 35,02	119,30 ± 20,27		0,00
THR x 10 ³	5,82 ± 1,65	5,33 ± 2,19	0,34	
CFU x 10 ⁴	16,89 ± 13,23	13,61 ± 11,49		0,22
MNC x 10 ⁸	0,96 ± 0,43	1,02 ± 0,23	0,54	
CD34 x 10 ⁶	74,33 ± 50,12	103,75 ± 55,93		0,00
Procount				
Vitale CD34 x 10 ³	59,07 ± 39,84	79,66 ± 49,63		0,09
Vitale Leukozyten	2,03 ± 0,62	2,08 ± 0,62	0,96	
CD34 aus 45/34	78,58 ± 45,96	97,96 ± 59,08		0,06

Tabelle 4 Wertevergleich der Absolutzahlen zwischen R60 und H60

Bei dem Vergleich der Absolutzahlen beider Sepax Verfahren S60 und H60 erzielte das S60 Verfahren durchgehend höhere Werte. Signifikant waren dabei WBC, ERY, THR und vitale Leukozyten, wie in Tabelle 5 dargestellt ist.

	S60	H60	Signifikanz	
	MW ± SD	MW ± SD	T-Test	Wilcoxon -Test
WBC x 10 ⁸	2,69 ± 0,65	2,32 ± 0,64	0,03	
ERY x 10 ⁹	159,34 ± 29,65	119,30 ± 20,10		0,00
THR x 10 ³	8,30 ± 4,66	5,33 ± 2,19		0,00
CFU x 10 ⁴	15,43 ± 13,16	13,61 ± 11,49		0,33
MNC x 10 ⁸	1,23 ± 0,39	1,02 ± 0,23		0,09
CD34 x 10 ⁶	120,49 ± 94,03	103,75 ± 55,93		0,26
Procount				
Vitale CD34 x 10 ³	97,85 ± 98,25	79,66 ± 49,63		0,27
Vitale Leukozyten	2,50 ± 0,70	2,08 ± 0,62	0,02	
CD34 aus 45/34	111,37 101,36	± 97,96 ± 59,08		0,59

Tabelle 5 Wertevergleich der Absolutzahlen zwischen S60 und H60

In der graphischen Gegenüberstellung erkennt man, dass nach Aufbereitung die Zellzahlen im S60 Verfahren näher am Ausgangswert (VB) lagen, als in den anderen Aufbereitungsgruppen.

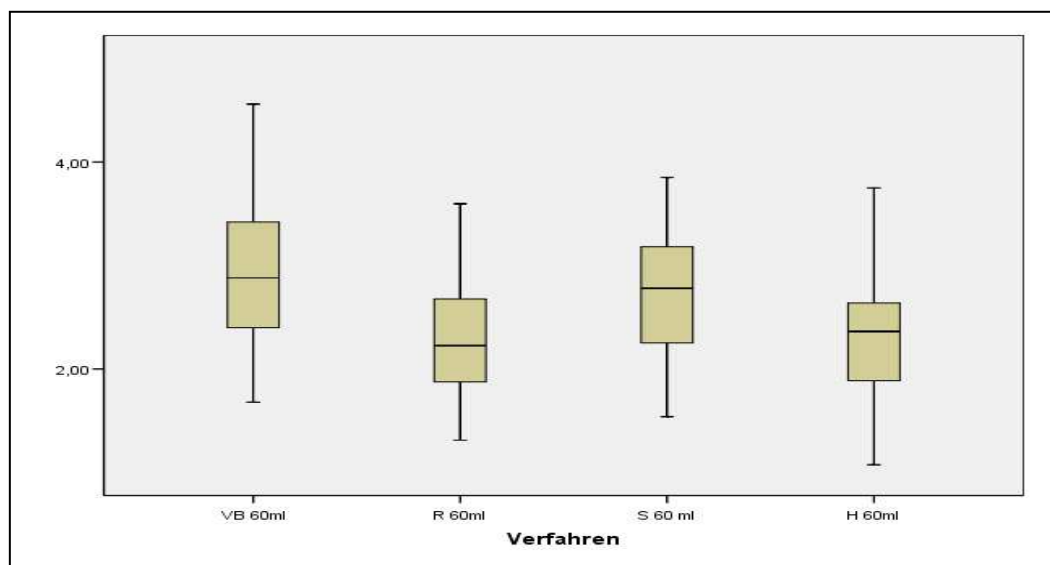


Abbildung 8 WBC x 10⁸ der Verfahren mit 60 ml

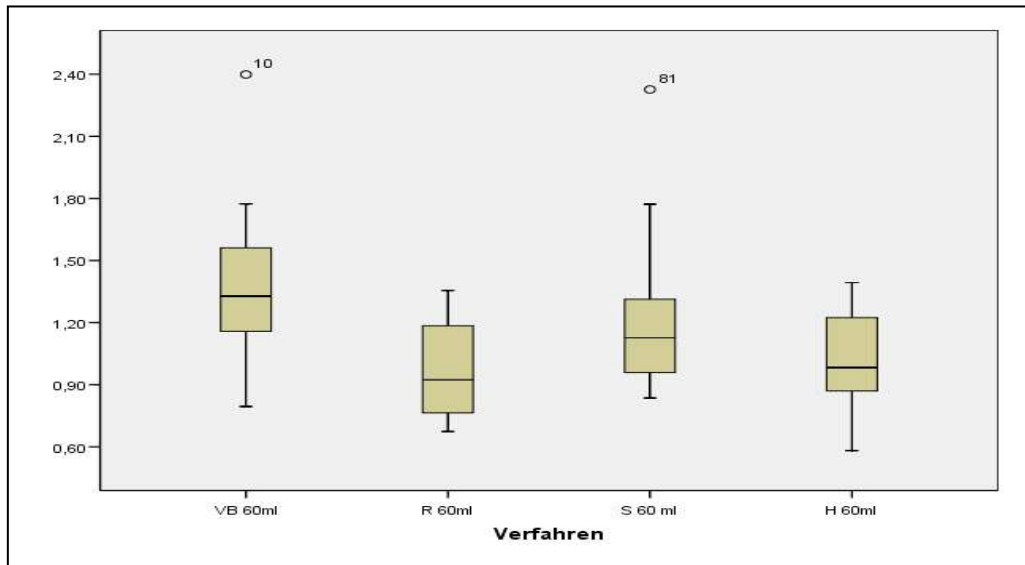


Abbildung 9 MNC x 10⁸ der Verfahren mit 60 ml

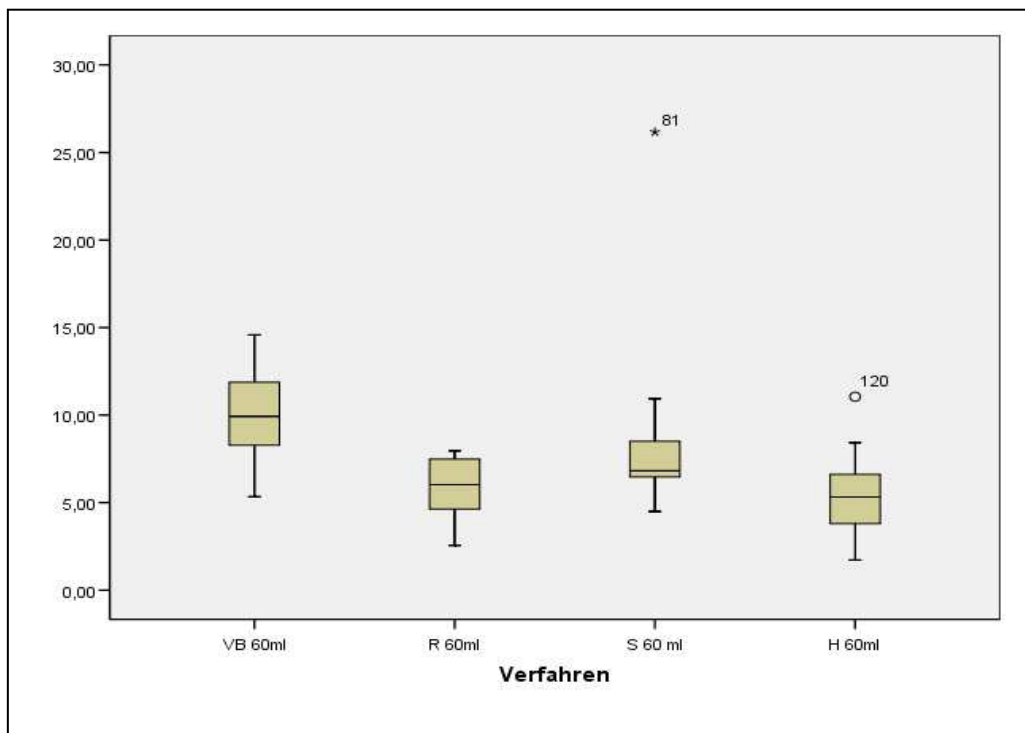


Abbildung 10 Thrombozyten x 10³ der Verfahren mit 60 ml

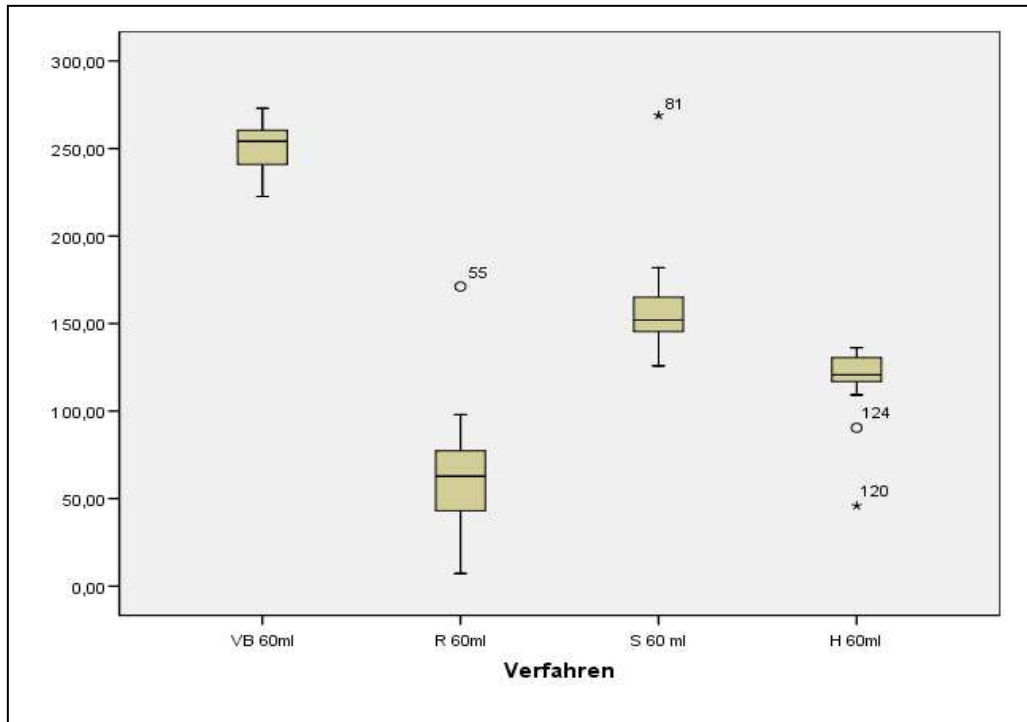


Abbildung 11 Erythrozyten x 10⁹ der Verfahren mit 60 ml

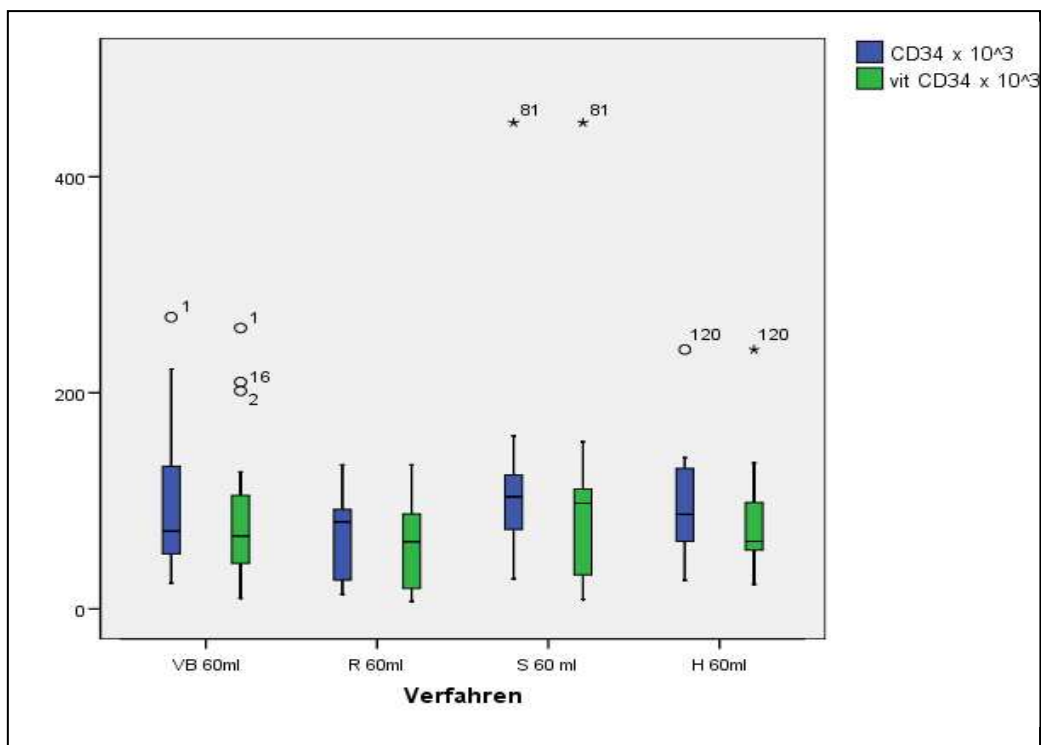


Abbildung 12 CD34 x 10³ und vitale CD34 x 10³ der Verfahren mit 60 ml

4.1.2 Wertevergleich absoluter Zellzahlen im Konzentrat der Verfahren mit 95 ml

Bei dem Vergleich der Absolutzahlen mit größerem Ausgangsvolumina (95 ml) zeigte das Sepax Verfahren ohne HES (S95) im Vergleich zum Rubinsteinverfahren (R95) in fast allen Werten signifikant höhere Absolutzahlen. Lediglich die vitalen CD34 und die CD34 aus 45/34 waren nicht signifikant (siehe Tabelle 6).

	R95	S95	Signifikanz	
	MW ± SD	MW ± SD	T-Test	W-Test
WBC x 10 ⁸	3,72 ± 1,13	4,59 ± 1,30	0,00	
ERY x 10 ⁹	116,99 ± 45,73	251,28 ± 60,03		0,00
THR x 10 ³	6,51 ± 1,77	11,62 ± 5,08	0,00	
CFU x 10 ⁴	19,38 ± 18,79	47,71 ± 76,95		0,04
MNC x 10 ⁸	1,64 ± 0,43	1,93 ± 0,56	0,03	
CD34 x 10 ⁶	139,39 ± 83,66	175,51 ± 89,08	0,049	
Procount				
Vitale CD34 x 10 ³	112,82 ± 76,97	138,76 ± 69,11		0,09
Vitale Leukozyten	3,54 ± 1,15	4,25 ± 1,30	0,01	
CD34 aus 45/34	143,59 ± 84,48	171,29 ± 87,48	0,11	

Tabelle 6 Wertevergleich der Absolutzahlen zwischen R95 und S95

Im Wertevergleich zwischen R95 und H95 fanden sich, abgesehen von den Thrombozyten, keine signifikant unterschiedlichen Zellzahlen. Bis auf höhere Werte der R95 Messung bei den Erythrozyten erzielte das H95 System durchgehend größere Absolutzahlen (vgl. Tabelle 7).

	R95	H95	Signifikanz	
	MW ± SD	MW ± SD	T-Test	W-Test
WBC x 10 ⁸	3,72 ± 1,13	4,01 ± 1,00	0,08	
ERY x 10 ⁹	116,99 ± 45,73	95,86 ± 30,51	0,07	
THR x 10 ³	6,51 ± 1,77	9,17 ± 3,58	0,00	
CFU x 10 ⁴	19,38 ± 18,79	24,28 ± 34,94		0,87
MNC x 10 ⁸	1,64 ± 0,43	1,76 ± 0,31	0,17	
CD34 x 10 ⁶	139,39 ± 83,66	153,75 ± 88,72	0,29	
Procount				
Vitale CD34 x 10 ³	112,82 ± 76,97	123,54 ± 75,37	0,29	
Vitale Leukozyten	3,54 ± 1,15	3,56 ± 0,98	0,82	
CD34 aus 45/34	143,59 ± 84,48	151,05 ± 91,48	0,53	

Tabelle 7 Wertevergleich der Absolutzahlen zwischen R95 und H95

Aus der Tabelle 8 wird der Vergleich von S95 und H95 ersichtlich. Dabei wies das S95 Verfahren durchgehend größere Werte als das H95 Verfahren auf. Die Signifikanzen waren unterschiedlich verteilt. ERY, THR, CD34 Procount und vitale Leukozyten waren signifikant höher im S95 Verfahren, WBC, CFU, MNC, vitale CD34 und CD34 aus 45/34 dagegen auf Seite des H95 Verfahrens.

	S95	H95	Signifikanz	
	MW ± SD	MW ± SD	T-Test	W-Test
WBC x 10 ⁸	4,59 ± 1,30	4,01 ± 1,00	0,06	
ERY x 10 ⁹	251,28 ± 60,03	95,86 ± 30,51		0,00
THR x 10 ³	11,62 ± 5,08	9,17 ± 3,58	0,03	
CFU x 10 ⁴	47,71 ± 76,95	24,28 ± 34,94		0,07
MNC x 10 ⁸	1,93 ± 0,56	1,76 ± 0,31	0,08	
CD34 x 10 ⁶	175,51 ± 89,08	153,75 ± 88,72	0,05	
Procount				
Vitale CD34	138,76 ± 69,11	123,54 ± 75,37		0,16
Vitale Leukozyten	4,25 ± 1,30	3,56 ± 0,98	0,02	
CD34 aus 45/34	171,29 ± 87,48	151,05 ± 91,48	0,17	

Tabelle 8 Wertevergleich der Absolutzahlen zwischen S95 und H95

Aus den Darstellungen mittels Boxplots wird ersichtlich, dass aus beiden Sepaxverfahren mit einem Ausgangsvolumen von 95 ml ohne Sedimentationsbeschleuniger jeweils die größte Zellmenge gesammelt wurde.

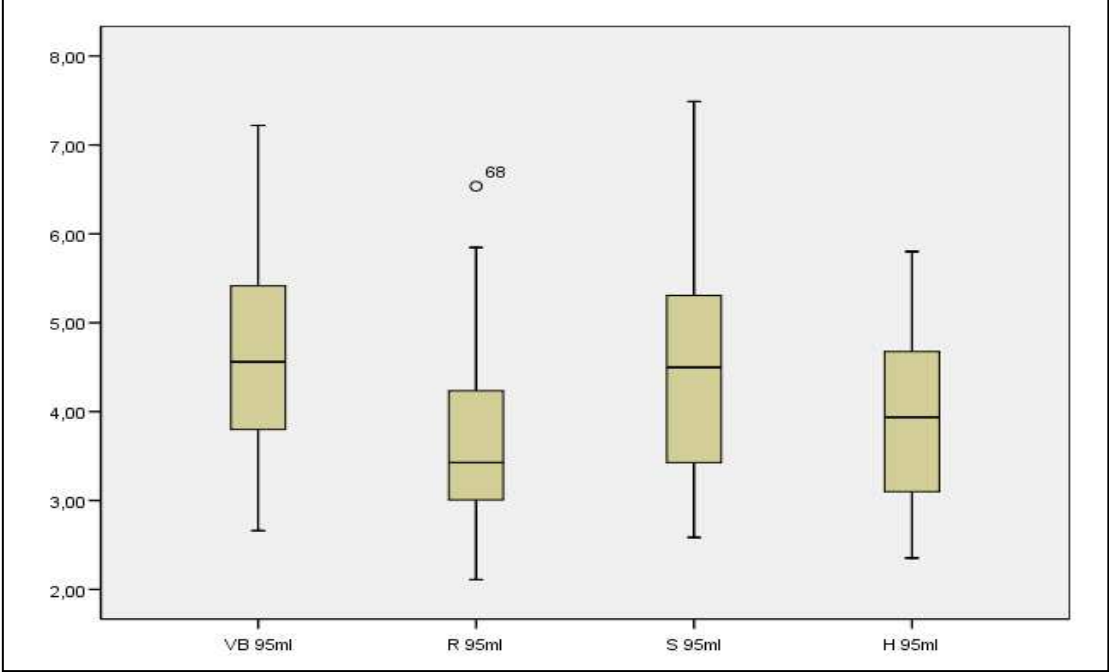


Abbildung 13 WBC x 10⁸ der Verfahren mit 95 ml

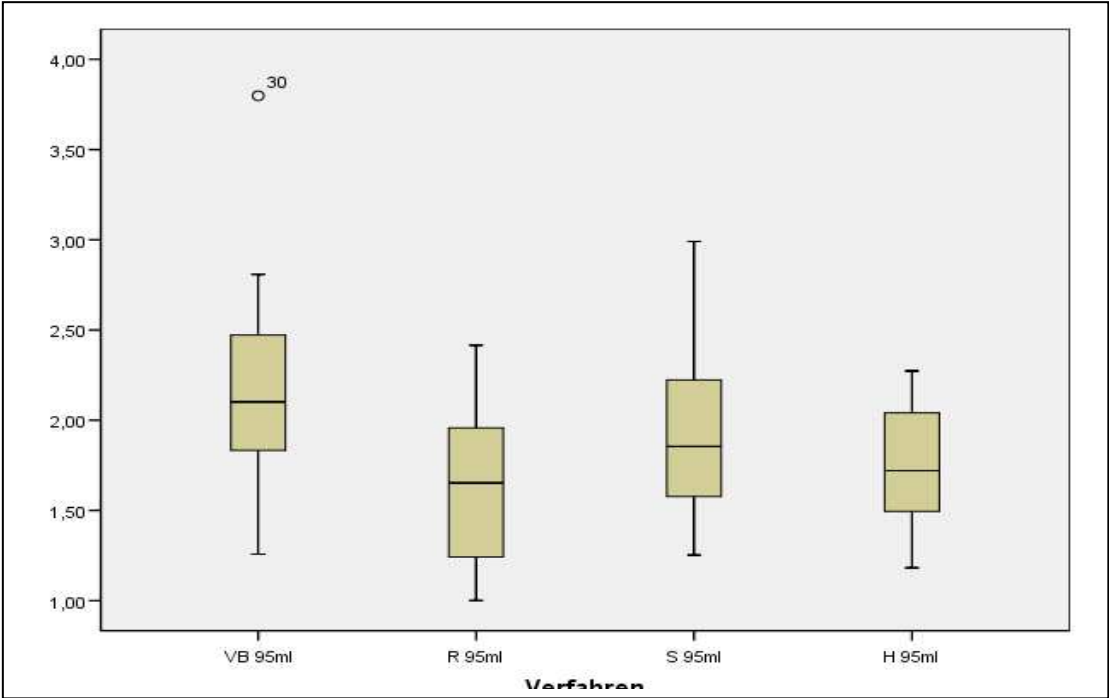


Abbildung 14 MNC x 10⁸ der Verfahren mit 95 ml

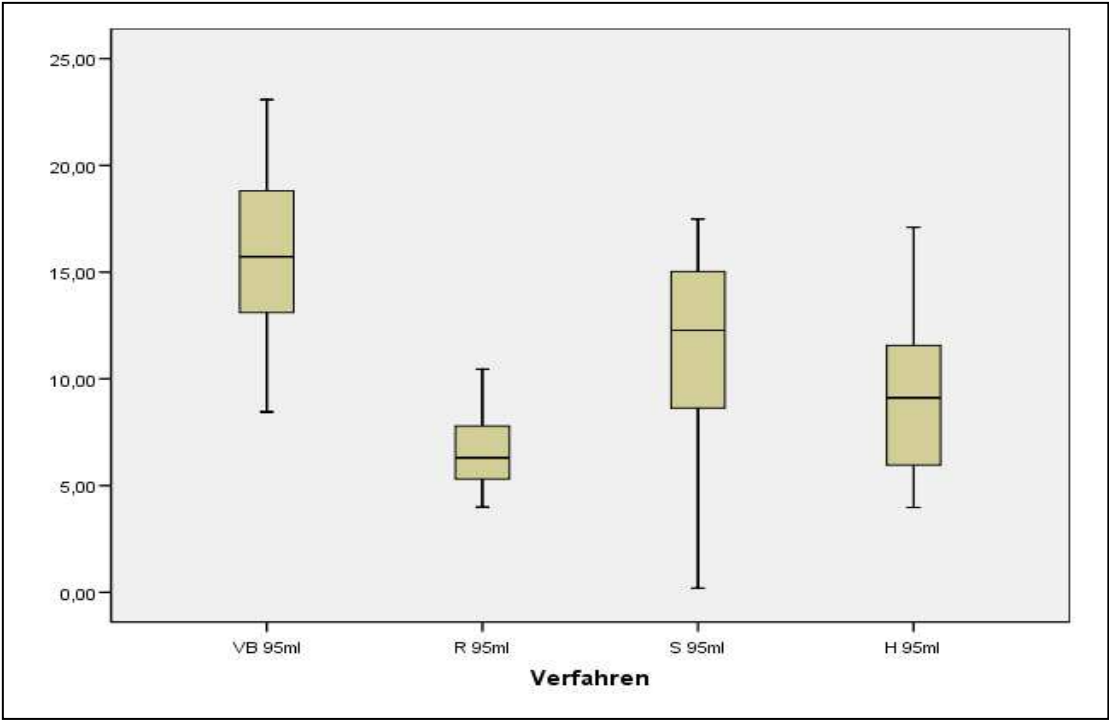


Abbildung 15 Thrombozyten x 10³ der Verfahren mit 95 ml

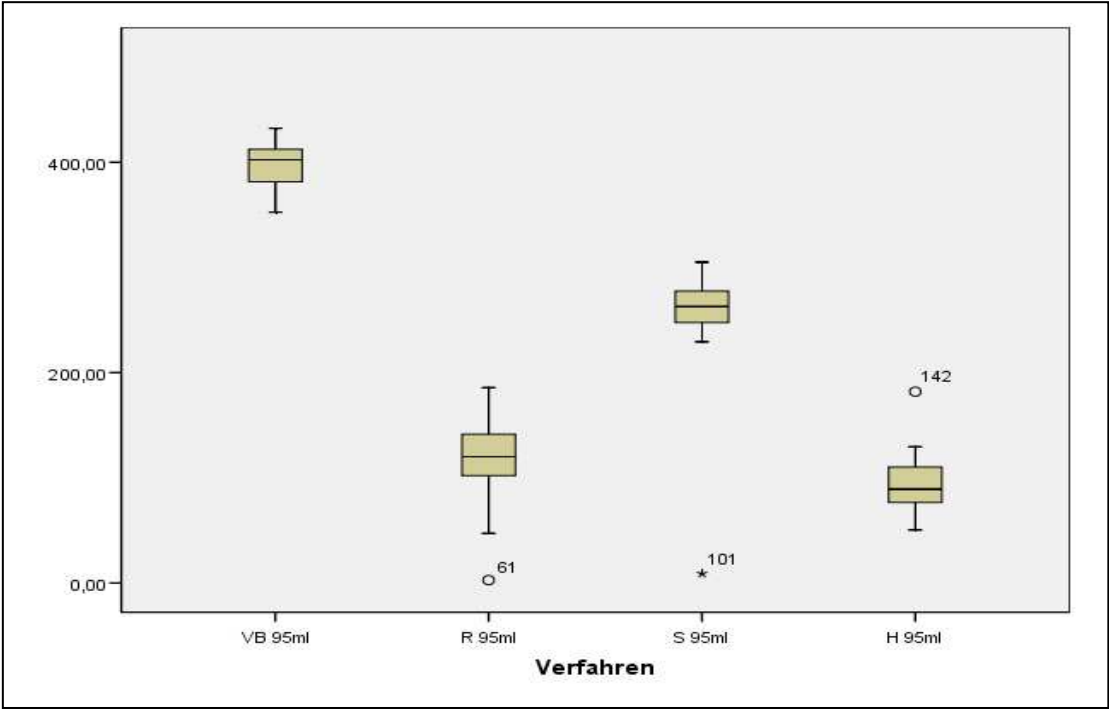


Abbildung 16 Erythrozyten x 10⁹ der Verfahren mit 95 ml

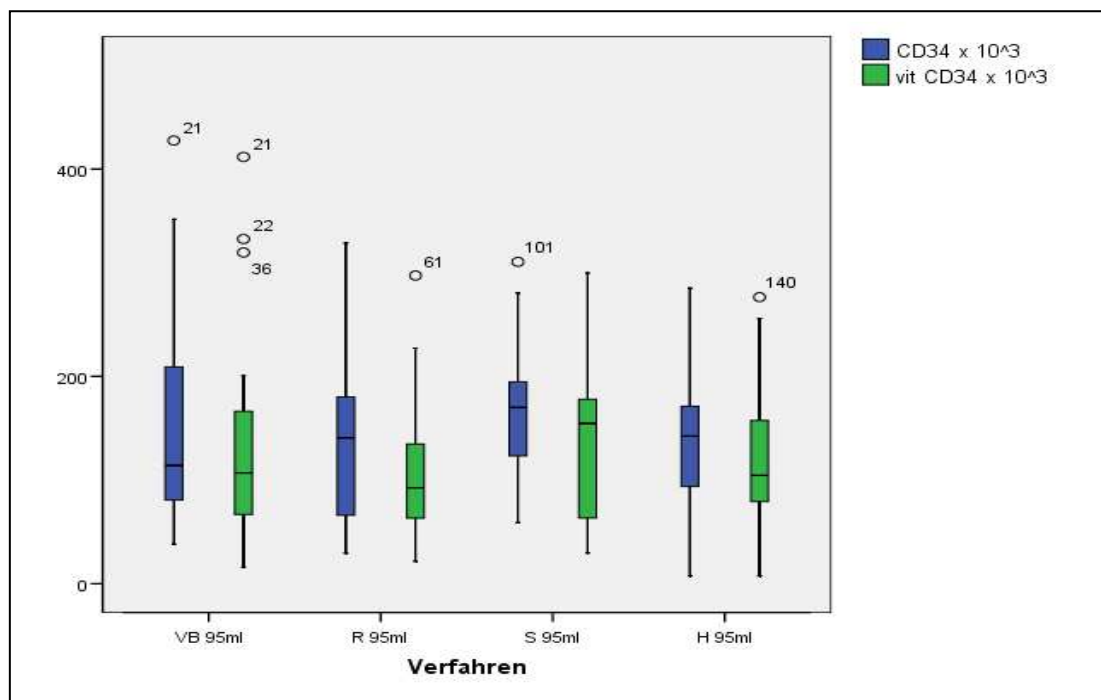


Abbildung 17 CD34 x 10³ und vitale CD34 x 10³ der Verfahren mit 95 ml

4.1.3 Zellausbeuten der Verfahren mit 60 ml

Wenn auch für jede Vergleichsgruppe die Ausgangszellmenge identisch war und somit die nun durch Präparation erzielten Zellmengen einen Vergleich ermöglichen, so ist doch die Zellausbeute ein anschaulicherer Wert zum Vergleich der Verfahren.

Vergleicht man die Ausbeuten der Verfahren mit kleinen Ausgangsvolumina (60 ml) miteinander, kam man zu einem ähnlichen Ergebnis wie bei den Absolutzahlen. Der Vergleich zwischen R60 und S60 zeigte in fast allen Parametern größere Ausbeute für das S60 Verfahren. Lediglich die koloniebildenden Zellen waren nicht signifikant größer (vgl. Tabelle 9).

	R60	S60	Signifikanz	
	MW ± SD	MW ± SD	T-Test	W-Test
WBC x 10 ⁸	74,51 ± 9,98	90,81 ± 19,64		0,00
ERY x 10 ⁹	26,19 ± 13,62	63,66 ± 10,07		0,00
THR x 10 ³	60,98 ± 19,45	93,26 ± 88,13		0,00
CFU x 10 ⁴	89,95 ± 81,55	107,37 ± 125,55		0,91
MNC x 10 ⁸	71,95 ± 16,45	91,20 ± 29,43		0,02
CD34 x 10 ⁶	79,62 ± 41,59	120,64 ± 43,58	0,00	
Procount				
Vitale CD34 x 10 ³	88,66 ± 52,12	121,84 ± 63,23	0,02	
CD34 aus 45/34	77,36 ± 40,52	105,04 ± 47,89	0,03	

Tabelle 9 Wertevergleich der Ausbeuten zwischen R60 und S60

In Tabelle 10 wird das R60 Verfahren dem H60 Verfahren gegenüber gestellt. Die Verteilung der Ausbeuten war genauso wie die der Signifikanzen sehr variabel. Mit dem R60 Verfahren ließen sich nicht signifikant höhere Ausbeuten bei den THR und CFUs erlangen. Im Gegenzug ergaben sich signifikant höhere Ausbeuten beim H60 Verfahren für ERY, CD34 Procount und für die vitalen CD34, nicht signifikant für WBC, MNC und CD34 aus 45/34.

	R60	H60	Signifikanz	
	MW ± SD	MW ± SD	T-Test	W-Test
WBC x 10 ⁸	74,51 ± 9,98	77,56 ± 14,52		0,10
ERY x 10 ⁹	26,19 ± 13,62	47,50 ± 8,64		0,00
THR x 10 ³	60,98 ± 19,45	56,76 ± 34,95		0,35
CFU x 10 ⁴	89,95 ± 81,55	84,40 ± 104,56		0,42
MNC x 10 ⁸	71,95 ± 16,45	76,42 ± 18,57		0,23
CD34 x 10 ⁶	79,62 ± 41,59	116,05 ± 54,76		0,01
Procount				
Vitale CD34 x 10 ³	88,66 ± 52,12	128,19 ± 94,78		0,05
CD34 aus 45/34	77,36 ± 40,52	97,95 ± 40,68		0,07

Tabelle 10 Wertevergleich der Ausbeuten zwischen R60 und H60

Der Vergleich zwischen S60 und H60 kam zu einem ähnlichen Ergebnis wie bei dem Vergleich von S60 mit R60. Abgesehen von den vitalen CD34 konnte bei S60 eine durchgehend größere Ausbeute festgestellt werden. Dabei waren die Leukozyten, Erythrozyten und die Thrombozyten signifikant, die übrigen Parameter aber nicht (vgl. Tabelle 11).

	S60	H60	Signifikanz	
	MW ± SD	MW ± SD	T-Test	W-Test
WBC x 10 ⁸	90,81 ± 19,64	77,56 ± 14,52		0,03
ERY x 10 ⁹	63,66 ± 10,07	47,50 ± 8,64		0,00
THR x 10 ³	93,26 ± 88,13	56,76 ± 34,95		0,00
CFU x 10 ⁴	107,37 ± 125,55	84,40 ± 104,56		0,35
MNC x 10 ⁸	91,20 ± 29,43	76,42 ± 18,57		0,09
CD34 x 10 ⁶	120,64 ± 43,58	116,05 ± 54,76		0,21
Procount				
Vitale CD34 x 10 ³	121,84 ± 63,23	128,19 ± 94,78		0,47
CD34 aus 45/34	105,04 ± 47,89	97,95 ± 40,68		0,33

Tabelle 11 Wertevergleich der Ausbeuten zwischen S60 und H60

4.1.4 Zellausbeuten der Verfahren mit 95 ml

Betrachtet man die Ausbeuten der drei unterschiedlichen Verfahren mit 95 ml, so ergab sich ein bereits bekanntes Bild. Bei dem Vergleich von R95 mit S95 präsentierte das S95 Verfahren in allen Parametern größere Ausbeuten, die bis auf die CFUs auch alle signifikant waren. (vgl. Tabelle 12).

	R95	S95	Signifikanz	
	MW ± SD	MW ± SD	T-Test	W-Test
WBC x 10 ⁸	77,91 ± 12,75	96,10 ± 24,55		0,00
ERY x 10 ⁹	29,38 ± 11,25	63,21 ± 14,65		0,00
THR x 10 ³	42,27 ± 12,98	74,76 ± 31,62	0,00	
CFU x 10 ⁴	84,59 ± 76,13	129,52 ± 95,05		0,09
MNC x 10 ⁸	76,42 ± 15,82	90,10 ± 20,08	0,03	
CD34 x 10 ⁶	89,83 ± 29,05	131,23 ± 52,14	0,00	
Procount				
Vitale CD34 x 10 ³	100,93 ± 43,10	135,69 ± 61,80	0,01	
CD34 aus 45/34	89,64 ± 34,88	117,80 ± 51,07	0,01	

Tabelle 12 Wertevergleich der Ausbeuten zwischen R95 und S95

Vergleicht man die beiden Verfahren R95 und H95, so wies H95 höhere Ausbeuten bei den WBC, THR, MNC, CD34 Procount, vitale CD34 und CD34 aus 45/34 auf, wobei nur WBC und THR signifikant waren. Dem gegenüber konnte man größere, aber nicht signifikante, Ausbeuten bei den ERYs und CFUs beim R95 Verfahren beobachten (vgl. Tabelle 13).

	R95	H95	Signifikanz	
	MW ± SD	MW ± SD	T-Test	W-Test
WBC x 10 ⁸	77,91 ± 12,75	84,96 ± 9,78	0,04	
ERY x 10 ⁹	29,38 ± 11,25	24,53 ± 7,38	0,08	
THR x 10 ³	42,27 ± 12,98	61,03 ± 29,54		0,00
CFU x 10 ⁴	84,59 ± 76,13	70,93 ± 18,97		0,59
MNC x 10 ⁸	76,42 ± 15,82	82,77 ± 16,34	0,12	
CD34 x 10 ⁶	89,83 ± 29,05	111,43 ± 60,18	0,15	
Procount				
Vitale CD34 x 10 ³	100,93 ± 43,10	129,22 ± 102,76		0,36
CD34 aus 45/34	89,64 ± 34,88	91,82 ± 37,58	0,82	

Tabelle 13 Wertevergleich der Ausbeuten zwischen R95 und H95

Werden die beiden Sepax Verfahren mit 95 ml miteinander verglichen zeigte das S95 Verfahren in allen Parametern bessere Ausbeuten als das H95 Verfahren. Dabei waren die Parameter WBC, MNC, CD34 Procount und vitale CD34 signifikant gegenüber ERY, THR, CFU und CD34 aus 45/34 nicht signifikant größer (vgl. Tabelle 14).

	S95	H95	Signifikanz	
	MW ± SD	MW ± SD	T-Test	W-Test
WBC x 10 ⁸	96,10 ± 24,55	84,96 ± 9,78		0,07
ERY x 10 ⁹	63,21 ± 14,65	24,53 ± 7,38		0,00
THR x 10 ³	74,76 ± 31,62	61,03 ± 29,54		0,04
CFU x 10 ⁴	129,52 ± 95,05	70,93 ± 18,97		0,01
MNC x 10 ⁸	90,10 ± 20,08	82,77 ± 16,34	0,12	
CD34 x 10 ⁶	131,23 ± 52,14	111,43 ± 60,18	0,08	
Procount				
Vitale CD34 x 10 ³	135,69 ± 61,80	129,22 ± 102,76		0,42
CD34 aus 45/34	117,80 ± 51,07	91,82 ± 37,58	0,01	

Tabelle 14 Wertevergleich der Ausbeuten zwischen S95 und H95

4.2 Verfahrensvergleich

4.2.1 Vergleich von Rubinstein 60 ml mit Rubinstein 95 ml

Die Unterschiede der Ausbeuten bei gleichem Verfahren mit unterschiedlichen Ausgangsvolumina nach der Präparation ist Gegenstand der folgenden Darstellung (vgl. Tabelle 15). R95 wies, abgesehen von den THR (als einziger Wert signifikant) und CFUs, die größeren Ausbeuten auf, die allesamt nicht signifikant waren.

	R60	R95	Signifikanz	
	MW ± SD	MW ± SD	T-Test	W-Test
WBC x 10 ⁸	74,51 ± 9,98	77,91 ± 12,75		0,29
ERY x 10 ⁹	26,19 ± 13,62	29,38 ± 11,25	0,33	
THR x 10 ³	60,98 ± 19,45	42,27 ± 12,98		0,00
CFU x 10 ⁴	89,95 ± 81,55	84,59 ± 76,13		0,38
MNC x 10 ⁸	71,95 ± 16,45	76,42 ± 15,82	0,21	
CD34 x 10 ⁶	79,62 ± 41,59	89,83 ± 29,05	0,19	
Procount				
Vitale CD34 x 10 ³	88,66 ± 52,12	100,93 ± 43,10	0,19	
CD34 aus 45/34	77,36 ± 40,52	89,64 ± 34,88	0,17	

Tabelle 15 Ausbeutevergleich zwischen R60 und R95 nach der Präparation

4.2.2 Vergleich von Sepax ohne HES 60 ml mit Sepax ohne HES 95 ml

In Tabelle 16 werden die Wesensmerkmale beider Sepax Verfahren ohne HES deutlich. Abgesehen von den mononukleären Zellen und den Thrombozyten zeigte das S95 Verfahren in den übrigen Parametern höhere Ausbeuten, wobei nur die Leukozytenausbeute signifikant war. Die ebenfalls signifikante Erythrozytenausbeute kann auf beiden Seiten als gleich angesehen werden.

	S60	S95	Signifikanz	
	MW ± SD	MW ± SD	T-Test	W-Test
WBC x 10 ⁸	90,81 ± 19,64	96,10 ± 24,55		0,04
ERY x 10 ⁹	63,66 ± 10,07	63,21 ± 14,65		0,03
THR x 10 ³	93,26 ± 88,13	74,76 ± 31,62		0,75
CFU x 10 ⁴	107,37 ± 125,55	129,52 ± 95,05		0,27
MNC x 10 ⁸	91,20 ± 29,43	90,10 ± 20,08		0,25
CD34 x 10 ⁶	120,64 ± 43,58	131,23 ± 52,14	0,33	
Procount				
Vitale CD34 x 10 ³	121,84 ± 63,23	135,69 ± 61,80	0,33	
CD34 aus 45/34	105,04 ± 47,89	117,80 ± 51,07	0,19	

Tabelle 16 Ausbeutevergleich zwischen S60 und S95 nach der Präparation

4.2.3 Vergleich von Sepax mit HES 60 ml mit Sepax mit HES 95 ml

Die Gegenüberstellung der beiden Sepax Verfahren mit HES zeigt in Tabelle 17 ein gemischtes Ergebnisbild. War das H95 Verfahren in den Ausbeuten von Leukozyten, Thrombozyten, mononukleären Zellen und vitale CD34+ Zellen dem H60 Verfahren überlegen, zeigte es in den anderen Parametern geringere Ausbeuten. Als signifikant waren dabei die WBCs, ERYs, MNCs und die vitalen Leukozyten zu werten.

	H60	H95	Signifikanz	
	MW ± SD	MW ± SD	T-Test	W-Test
WBC x 10 ⁸	77,56 ± 14,52	84,96 ± 9,78		0,02
ERY x 10 ⁹	47,50 ± 8,64	24,53 ± 7,38		0,00
THR x 10 ³	56,76 ± 34,95	61,03 ± 29,54		0,33
CFU x 10 ⁴	84,40 ± 104,56	70,93 ± 18,97		0,33
MNC x 10 ⁸	76,42 ± 18,57	82,77 ± 16,34		0,00
CD34 x 10 ⁶	116,05 ± 54,76	111,43 ± 60,18		0,55
Procount				
Vitale CD34 x 10 ³	128,19 ± 94,78	129,22 ± 102,76		0,84
CD34 aus 45/34	97,95 ± 40,68	91,82 ± 37,58		0,78

Tabelle 17 Ausbeutevergleich zwischen H60 und H95 nach der Präparation

5. Diskussion

Zur Behandlung von hämatologischen Erkrankungen und Tumoren ist häufig eine Hochdosishemo-/Radiotherapie notwendig. Gerade diese Therapieform ist mit einer z.T. ausgeprägten Hämatotoxizität verbunden, die für den Patienten potentiell tödlich enden kann. Ziel im Rahmen einer solchen Behandlung ist daher auch die schnellst mögliche Rekonstitution der Hämatopoese durch Transplantation hämatopoetischer Stamm – und Vorläuferzellen [34, 40, 57, 64]. In den vergangenen 30 Jahren hat sich ein Wandel von der Stammzellgewinnung aus Knochenmark hin zur Gewinnung aus peripherem Blut vollzogen. Dafür sprechen insbesondere eine schnellere hämatologische und immunologische Rekonstitution und somit eine geringere Morbidität.

Bei der Suche nach weiteren Stammzellquellen rückte das Nabelschnurblut in den Fokus des Interesses, da während des Geburtsvorganges das Nabelschnurblut aufgrund der fetalen Hämatopoeseentwicklung einen hohen Anteil an Stammzellen aufweist [58, 85]. Seit der ersten erfolgreichen NSBT 1988 [38] wurden viele weitere Studien zur klinischen Anwendung von NSBT durchgeführt [39, 66, 68]. Gegenüber den Vorteilen hoher Proliferationspotentiale und geringer GVHD sind jedoch große logistische Aufwände, eine Stammzellanreicherung mit anschließender Kryokonservierung und eine kostenintensive Langzeitlagerung zu erwähnen.

Der erfolgreiche klinische Gebrauch dieser NSBT führten zu einem großen Interesse NSB Banken für die schnellst mögliche Verfügbarkeit von Transplantaten verschiedener HLA-Typen einzurichten. Limitierende Faktoren sind die hohen Lagerungskosten, die bei der Unterbringung in speziell mit Stickstoff gekühlten Tanks entstehen. Ein wichtiges Ziel war daher die Reduktion des Volumens der NSBT vor der Kryokonservierung bei maximaler Anreicherung vitaler Stammzellen [67], um zum Einen eine höhere Anzahl an Präparaten lagern zu können, zum Anderen die Toxizität des DMSO und der geschädigten Zellbestandteile, die bei einer Infusion mit dem NSBT ebenfalls infundiert werden würde, möglichst gering zu halten.

Zur Herstellung eines Stammzelltransplantates sind verschiedene Schritte notwendig. Handelt es sich um die Herstellung eines Stammzelltransplantates aus Nabelschnurblut muss in erster Linie ein genügend großes Ausgangsvolumen bei der Punktion der Nabelvenen des Neugeborenen und der Plazenta erzielt werden. Je nach Technik und Zeitpunkt der Entnahme ergeben sich deutlich unterschiedliche Angaben bzgl. der Zell- und Volumenausbeute. In der Literatur werden Sammelvolumen bis zu 220ml angegeben, in den meisten Fällen werden jedoch zwischen 75 ml

und 110ml NSB gewonnen [31, 32, 52, 60, 62, 71, 75]. Die Konzentrationen an kernhaltigen Zellen werden zwischen $7,2$ und $17,6 \times 10^8$ NC/Einheit, die der CD34+ Zellen zwischen $1,95$ und $3,8 \times 10^6$ Einheit angegeben [31, 32, 52, 60, 62, 75].

Nach den für Deutschland geltenden Richtlinien muss das Ausgangsvolumen mindestens 60 ml und die Anzahl der kernhaltigen Zellen nach der eventuellen Anreicherungs - prozedur mindestens 5×10^8 betragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit peripherem Blut gesunder Spender gearbeitet, da dieses die einzige Möglichkeit darstellt, gepaarte Vergleiche mit identischen Ausgangsmaterialien für unterschiedliche Prozeduren durchzuführen. NSB hätte aufgrund der kleinen und unterschiedlichen Volumina keine gute Basis für den Vergleich der verschiedenen Aufbereitungsverfahren liefern können. Die Volumenvorgabe war mit 60 ml und 95 ml pro Verfahren gewählt worden, weil 60 ml die nach deutschen Richtlinien geltenden Volumensuntergrenze ist [19] und ein Volumen von 95 ml bei den in Erlangen entnommenen Nabelschnurblutspenden den Mittelwert der Volumina der akzeptierten NSB Präparate repräsentiert. Diese Volumenentscheidung erlaubte ferner, aus jeder Blutspende sowohl für beide Volumengruppen (60 ml und 95 ml), als auch für alle 3 Aufbereitungsverfahren direkte Vergleichspaare aus dem Ausgangsmaterial zu bilden.

Gegenstand dieser Arbeit war der Vergleich der Verfahren nach Rubinstein, des Zweizyklus-Sepaxverfahrens ohne HES und des Zweizyklus-Sepaxverfahren mit HES. Dabei wurde insbesondere untersucht, mit welchem Präparationsverfahren zum Einen die höchste Ausbeute für Leukozyten, MNCs und CD34+ Zellen und zum Anderen die besten Abreicherungen von Erythrozyten und Thrombozyten erzielt werden konnten. Die Präparation des Vollblutes stand hierbei also exemplarisch für die PRB-Aufbereitungsverfahren. Das Hauptaugenmerk der Interpretation der Daten sollte sich daher auf die prozentuale Zellausbeute richten.

Bei der Beurteilung der Ergebnisse der drei unterschiedlichen Verfahren wurden Tabelle 3 – 17 herangezogen. Nach abgeschlossener Präparation wurde deutlich, dass das Sepax Verfahren ohne HES sowohl bei einem Ausgangsvolumen von 60 ml als auch bei einem Ausgangsvolumen von 95 ml die besten Ergebnisse lieferte. Mit einer Leukozytenausbeute von $96,10 \pm 24,55$ % war es dem Sepax-Verfahren mit HES ($84,96 \pm 9,78$ %) und dem Rubinsteinverfahren ($77,91 \pm 12,75$ %) deutlich überlegen. Höhere Ausbeuten bei den MNCs, den CFUs, den CD34+ gemessenen Zellen, den vitalen CD34+ Zellen, den vitalen Leukozyten und den CD34+ Zellen waren ähnlich deutlich zu sehen. Allerdings muss dabei beachtet werden, dass hierbei auch geringere Abreicherungen bei den Erythrozyten und Thrombozyten erzielt wurden. Gerade diese

beiden Blutbestandteile sind jedoch die Faktoren, die das Transplantat während der Kryokonservierung negativ beeinflussen und die Qualität des Transplantates zum Teil mindern können.

Neben dieser Beobachtung zeigte auch das Verfahren Sepax mit HES, gegenüber dem momentanen Standardverfahren zur Gewinnung von Stammzellkonzentraten aus NSB nach Rubinstein, höhere Ausbeuten. Sowohl bei den Leukozyten, mononukleären Zellen und CD34+ Zellen als auch bei den vitalen CD34+ Zellen wies es höhere Werte auf. Das Rubinsteinverfahren hingegen ergab unabhängig vom Ausgangsvolumen höhere Ausbeuten bei den vitalen Leukozyten und den koloniebildenden Zellen.

Die Thrombozyten – und Erythrozytenausbeute musste in Abhängigkeit vom Volumen getrennt betrachtet werden. Bei einem Ausgangsvolumen von 60 ml führte das Rubinsteinverfahren mit $60,98 \pm 19,45$ % gegenüber $56,76 \pm 34,95$ nach dem Sepax Verfahren mit HES zu einer höheren Kontamination an Thrombozyten. Bei einem Ausgangsvolumen von 95 ml zeigte es hingegen mit $29,38 \pm 11,25$ % eine größere Erythrozytenkontamination als das Sepax Verfahren mit $24,53 \pm 7,38$ %. Entgegengesetzte Verhältnisse zeigt das Sepax Verfahren mit HES.

Somit lässt sich anhand dieser Ergebniszusammenfassung eine Wertigkeit der Verfahren aufstellen.

Beide Verfahren mit dem Zellseparator Sepax erwiesen sich bezüglich der Zellausbeute (kernhaltige Zellen, MNC und CD34+Zellen) dem Rubinsteinverfahren überlegen, wobei das Verfahren mit dem Zellseparator Sepax ohne Sedimentationsbeschleuniger dem Verfahren mit HES auf Kosten höherer Erythrozytenkonzentrationen überlegen war.

Allerdings wies das Rubinsteinverfahren gegenüber dem Sepax Verfahren ohne HES die geringste Beimengung von unerwünschten Blutbestandteilen auf. Die Beurteilung der Reinheit des Leukozytenkonzentrates bei einem Vergleich zwischen Rubinsteinverfahren und Sepax mit HES ist schwierig. In wie weit diese Beobachtung auf das Endresultat Einfluss nimmt, müsste anhand weiterer Studien untersucht werden.

Vergleicht man die hier erhobenen Daten mit Ergebnissen früherer Studien erlangten wir vergleichbare, z.T. höhere Werte für die Ausbeute an WBCs (S95 mit $96,10 \pm 24,55$) in einem mit 2 Zyklen computergesteuerten Sepax Gerät, wobei wir allerdings mit HES als Sedimentationsbeschleuniger gearbeitet haben. Die Entscheidung zu Gunsten HES fiel aufgrund vorangegangener Studien, die unterschiedliche Dichtegradien - zentrifugationen für die

Präparation der LKs wie Ficoll-Hypaque [45] und Percoll oder Sedimentationsbeschleuniger wie Poligeline [2] verwendet haben.

In einer umfangreichen Arbeit zeigten Tsang et al [82] dass Dichtegradientenlösungen wie Ficoll und Percoll zwar eine höhere Reinheit der Präparate erzielen können, allerdings mit einer schlechten Zellausbeute einhergehen. Eine hohe Reinheit der LKs ist aber ein wesentlicher Punkt in der Beurteilung der Qualität des Transplantates. Im Gegensatz zu Dazey et al [28] konnten wir eine bessere Verringerung der ERYs, im Vergleich zur manuellen Herstellung, im computergesteuerten Sepax Gerät nur in der Gruppe der Sepax mit HES Präparate bei 95 ml (H95) mit $24,53 \pm 7,38$ erlangen. Wir erzielten im Gegensatz zur früheren Studie von Zingsem et al [88] bessere Ausbeuten an WBCs und CD34+ und stimmen daher mit dem Ergebnis der Studie von Dazey et al überein. Ein Grund für die teilweise sogar deutlich höheren Ausbeuten könnte in dem größeren Volumen im Vergleich zu der Studie von 2003 [88] liegen ($95 \text{ ml vs. } 75,5 \pm 10 \text{ ml}$). In unserer vorliegenden Studie konnten wir zeigen, dass ein höheres Ausgangsvolumen in jedem Fall eine bessere Zellausbeute mit sich bringt.

Wegen der im Vollblut gesunder Spender in sehr geringer Zahl vorhandenen koloniebildenden Zellen und eher großen Streuungen bei der CFU Auswertung, wurde auf einen quantitativen CFU Vergleich verzichtet und nur der Wachstumsnachweis beurteilt.

Über den 7-AAD Ausschluss konnte gezeigt werden, dass keine qualitativen Unterschiede bezüglich eventueller Zellschädigungen einzelner Aufbereitungsverfahren bestanden. Durch die in den CFU Ansätzen nachgewiesene Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit der aufbereiteten Zellen konnte bestätigt werden, dass die per Durchflusszytometrie erhobenen Vitalitätsdaten eventuelle Zellschädigungen hinreichend gut anzeigten.

Bei der Analyse der Zellausbeuten ergaben sich auch Werte über 100% wie zum Beispiel die Ausbeute der CD34+ Zellen von $104,21 \pm 58,44$ beim Einsatz des R60-Verfahrens. Diese 100% übersteigenden Ausbeuten erklären sich durch die Summierung verschiedener Messungstoleranzen. So wurden die Volumina der Präparate und Produkte über die Gewichtsbestimmung der vollen Blutbeutel nach Division durch die Dichte des Blutes ermittelt und auf ganze Milliliterwerte gerundet. Bei einem Ausgangsvolumen von 60 ml resultiert aus einer Toleranz von 1ml bereits eine Abweichung von 1,67%, bei einem Produkt von 30ml sogar von 3,3%. Ferner wurde die Leukozytenkonzentration mit einem Blutzellzählgerät bestimmt. Dieses Gerät weist eine Messtoleranz von bis zu 5% auf. Somit konnte mit je einer Messung vor und nach der Präparation der Proben bereits eine Schwankungsbreite von bis zu 10% entstehen. Auch bei der CD34+ Bestimmung mit dem Durchflusszytometer zeigte sich eine Schwankungsbreite von 10 – 20%. Dabei ist der Variationskoeffizient umgekehrt Proportional

zum Ausgangsvolumen bzw. der Ausgangskonzentration der Proben, d.h. je kleiner die Ausgangskonzentration bzw. das Ausgangsvolumen ist, desto höher ist der Variationskoeffizient. Mögliche untersucherabhängige Fehlerquellen lagen in der Volumenbestimmung der Proben nach Präparation, die durch visuelle Bestimmung anhand der Spritzenskala erfolgte, sowie in der Gewichtsbestimmung der Präparate anhand unterschiedlich verbliebener Schlauchsegmente und der z.T. unterschiedlichen Lage der Beutel auf der Waage.

In den darauf folgenden Berechnungen der Absolutzahlen, die durch Multiplikation des Volumens des Ausgangsmaterials mit der Konzentration des Ausgangsmaterials berechnet wurde, kam es folglich zu Summierungen der Messfehler.

Insgesamt durchliefen alle Proben sechs Messungen, die jede für sich eine gewisse Messtoleranz in sich barg. Diese Tolleranzen addierten sich. Im Ganzen blieben die Ergebnisse jedoch vergleichbar, da alle Proben die gleichen Messungen durchlaufen haben.

Die Beurteilung der Ergebnisse lassen vorerst den Schluss zu, dass das Sepax Verfahren ohne HES die besten Ergebnisse lieferte.

Ein möglicher Ansatzpunkt liegt in der Tatsache, dass das Sepax Verfahren ohne HES im Gegensatz zum Rubinsteinverfahren und dem Sepax Verfahren mit HES nicht mit jenem Plasmaexpander arbeitete.

Abschließend lässt sich sagen, dass eine in 2 Zyklen durchgeführte, computergesteuerte Präparation mit dem Sepax System deutlich bessere Ausbeuten an WBCs, MNCs und CD34+ Zellen als andere Aufbereitungsverfahren bietet. Die Reduktion der ERYs ist allerdings effektiver, wenn HES hinzugefügt wurde. Es bestehen große Vorteile in dem Präparationsverfahren mit geschlossenem System. Zum Einen ist die Gefahr der Kontamination sehr gering gehalten, zum Anderen birgt es die Möglichkeit eines standardisierten Ablaufes mit z.T. erheblich kürzerer Präparationszeit.

In bereits durchgeführten Studien wurde ein kryoprotektiver Effekt des HES postuliert. Es war nicht Gegenstand dieser Arbeit eine Antwort auf diese Frage zu geben, jedoch können gewisse Überlegungen diskutiert werden.

Diese Überlegung führt letztendlich zu der Frage, ob die Ausbeute an vitalen Stammzellen zur Erstellung eines Stammzelltransplantates dadurch verbesserte werden könnte, wenn die Präparation des Ausgangsmaterials, unabhängig vom Volumen, nach dem Sepax Verfahren ohne

HES durchgeführt und das HES nicht schon während der Präparation, sondern erst als Bestandteil der Gefrierschutzlösung kurz vor der Kryokonservierung hinzugefügt werden würde.

6. Literaturverzeichnis

1. Abrams, RA., Johnston-Early, A., Kramer, C., Minna, JD., Cohen, MH., Deisseroth, AB., (1981), Amplification of circulating granulocyte-monocyte stem cell numbers following chemotherapy in patients with extensive small cell carcinoma of the lung. *Cancer Res*, 41: 35-41.
2. Almici, C., Carlo-Stella, C., Mangoni, L., Garau, D., Cottafavi, L., Ventura, A., Armanetti, M., Wagner, J.E., Rizzoli, V., (1995), Density separation of umbilical cord blood and recovery of hematopoietic progenitor cells: implications for cord blood banking. *Stem Cells*, 13: 533-40
3. Alonso, J.M. 3rd, Regan, D.M., Johnson, C.E., Oliver, D.A., Fegan, R., Lasky, L.C., Wall, D.A., (2001), A simple and reliable procedure for cord blood banking, processing and freezing: St. Louis and Ohio Cord Blood Bank experiences. *Cytotherapy* 3: 429-433.
4. Anderson, S., Fangman, J., Wager, G., Uden, D., (1992), Retrieval of placental blood from the umbilical vein to determine volume, sterility, and the presence of clot formation. *Am J Dis Child*, 146: 36-39
5. Andrews, R.G., Singer, J.W., Bernstein, I.D., (1986), Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood*, 67: 842-5.
6. Ashwood-Smith, M.J., (1975), Current concepts concerning radioprotective and cryoprotective properties of dimethyl sulfoxide in cellular systems. *Ann N Y Acad Sci*, 243: 246-56.
7. Baldini, M.G., (1975), Discussion paper: dimethyl sulfoxide as a cryoprotective agent for platelet preservation by freezing. *Ann N Y Acad Sci*, 243: 306-7.

8. Ballen, K., Broxmeyer, H.E., Mc Cullough, J., Piaciabello, W., Rebullia, P., Verfaillie, C.M., Wagner, J.E., (2001), Current status of cord blood banking and transplantation in the United States and Europe. *Biol Blood Marrow Transplant*, 7: 635-645.
9. Ballin, A., Arbel, E., Kenet, G., Berar, M., Kohelet, D., Tanay, A., Zakut, H., Meytes, D., (1995), Autologous cord blood transfusion. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 73: 181-183.
10. Barker, J.N., Wagner, J.E., (2002), Umbilical cord blood transplantation: current state of the art. *Curr Opin Oncol*. 14: 160-164.
11. Becker, P.S., Wagle, M., Matous, M., Swanson, R.S., Pihan, G., Lowry, P.A., Stewart, F.M., Heard, S.O., (1997), Spontaneous splenic rupture following administration of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): occurrence in an allogeneic donor of peripheral blood stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant*, 3: 45-9.
12. Belvedere, O., Feruglio, C., Malangone, W., Bonora, M.L., Minisini, A.M., Spizzo, R., Donini, A., Sala, P., De Anna, D., Hilbert, D.M., Degrassi, A., (2000), Increased blood volume and CD34(+)CD38(-) progenitor cell recovery using a novel umbilical cord blood collection system. *Stem Cells*, 18: 245-251.
13. Bender, J.G., Unverzagt, K.L., Walker, D.E., Lee, W., Van Epps, D.E., Smith, D.H., Stewart, C.C., (1991), Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulation from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. *Blood*, 77: 591-6.
14. Bensinger, W., Singer, J., Appelbaum, F., Lilleby, K., Longin, K., Rowley, S., Clarke, E., Clift, R., Hansen, J., Shields, T., (1993), Autologous transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant granulocyte stimulating factor. *Blood*, 81: 3158-63.
15. Bertolini, F., Lazzari, L., Lauti, E., Corsini, C., Castelli, C., Gorini, F., Sirchia, G., (1995), Comparative study of different procedures for the collecting and banking of umbilical cord blood. *J. Hematother*, 4: 29-36.

16. Bishop, M.R., Anderson, J.R., Jackson, J.D., Bierman, P.J., Reed, E.C., Vose, J.M., Armitage, J.O., Warkentin, P.I., Kessinger, A., (1994), High-dose therapy and peripheral blood progenitor cell transplantation: effects of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the autograft. *Blood*, 83: 610-6.
17. Brobyn, R.D., (1975), The human toxicology of dimethyl sulfoxide. *Ann N Y Acad Sci*, 243: 497-506.
18. Bruno, A., Ballatore, G., Adorno, G., Caravita, T., Venditti, A., del Poeta, G., Stasi, R., Buccisano, F., Santinelli, S., Picardi, A., Calugi, A., Tribalto, M., Amadori, S., (1997), Red blood cell depletion and cryopreservation of umbilical cord blood (UCB). *Bone Marrow Transplant*, 20: 89-90.
19. Bundesärztekammer Bekanntmachungen. Richtlinien zur Transplantation von Stammzellen aus Nabelschnurblut (CB = cord blood). *Deutsches Ärzteblatt* 1999; 96:1297-1304.
20. Cassens, U., Ahlke, C., Garritsen, H., Krakowitzky, P., Wüllenweber, J., Fischer, R.J., Peters, G., Sibrowski, W., (2002), Processing of peripheral blood progenitor cells components in improved clean areas does not reduce the rate of microbial contamination. *Transfusion*, 42: 10-17.
21. Chao, N.J., Schriber, J.R., Grimes, K., Long, G.D., Negrin, R.S., Raimondi, C.M., Horning, S.J., Brown, S.L., Miller, L., Blume, K.G., (1993), Granulocyte colony-stimulating factor "mobilized" peripheral blood progenitor cells accelerate granulocyte and platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Blood*, 81: 2031-5.
22. Civin, C.I., Strauss, L.C., Brovall, C., Fackler, M.J., Schwartz, J.F., 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: 157-65.
23. Craig, J.I., Turner, M.L., Parker, A.C., (1992), Peripheral blood stem cell transplantation. *Blood Rev*, 6: 58-67.

24. Dausset, J., (1953), Immuno-hématologie des plaquettes et des leucocytes. Presse Medicale, 61: 1533-5.
25. Dausset, J., (1958), Iso-leuco-anticorps. Acta Haemat, 20: 156-66.
26. Dausset, J., (1981), The major histocompatibility complex in man. Science, 213 (4515): 1469-74.
27. David, N.A., (1972), The pharmacology of dimethyl sulfoxide. Annu Rev Pharmacol, 12: 353-74.
28. Dazey, B., Duchez, P., Letellier, C., Vezon, G., Ivanovic, Z., (2005), Cord blood processing by using a standard manual technique and automated closed system "Sepax" (Kit CS-530). Stem Cells Dev, 14: 6-10.
29. Eckstein, R., Riess, H., Siegert, W., Hämatologie. Kohlhammer-Verlag, Stuttgart, 1991, 157-173.
30. Eichler, H., Schaible, T., Richter, E., Zieger, W., Voller, K., Leveringhaus, A., Goldmann, S.F., (2000) Cord blood as a source of autologous RBCs for transfusion to preterm infants. Transfusion, 40: 1111-1117
31. Eichler, H., Meckies, J., Schmut, N., Kern, S., Kluter, H., Zieger, W., (2001) Aspects of donation and processing of stem cell transplants from umbilical cord blood. Z Geburtshilfe Neonatol, 205: 218-223.
32. Elchalal, U., Fasouliotis, S.J., Shtockheim, D., Brautbar, C., Schenker, J.G., Weinstein, D., Nagler, A., (2000), Postpartum umbilical cord blood collection for transplantation: a comparison of three methods. Am J Obstet Gynecol, 182: 227-232.
33. Falzetti, F., Aversa, F., Minelli, O., Tabilio, A., (1999), Spontaneous rupture of spleen during peripheral blood stem-cell mobilisation in a healthy donor. Lancet, 353: 555.

34. Gale, R.P., Henon, P., Juttner, C., (1992), Blood stem cell transplants come of age. *Bone Marrow Transplant*, 9: 151-5.
35. Galmes, A., Besalduch, J., Bargay, J., Novo, A., Morey, M., Guerra, J.M. Duran, M.A., (1999), Long-term storage at -80 degrees C of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide as the sole cryoprotectant. *Transfusion*, 39: 70-73.
36. Garritsen, H.S., Brune, T., Nickel, S., Heuer, A., Rabe, H., Jorch, G., Sibrowski, W., (1995), Collection and processing of placental blood for autologous blood transfusions in neonates. *Proceedings of the ISBT Congress, Venice, Italy*, p 273-277.
37. Gianni, A.M., Siena, S., Bregni, M., Tarella, C., Stern, A.C., Pileri, A., Bonadonna, G., (1989), Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haematopoietic stem cells for autotransplantation. *Lancet*, 2: 580-5.
38. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P., (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: 1174-8.
39. Gluckman, E., Rocha, V., Boyer-Chammard, A., Locatelli, F., Arcese, W., Pasquini, R., Ortega, J., Souillet, G., Ferreira, E., Laporte, J.P., Fernandez, M., Chastang, C., (2001), Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med*, 1997. 337(6): p. 373-81.
40. Gorin, N.C., David, R., Stachowiak, J., Salmon, C., Petit, J.C., Parlier, Y., Najman, A., Duhamel, G., (1981), High-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation in acute leukemias, malignant lymphomas and solid tumors. A study of 23 patients. *Eur J Cancer*, 17: 557-68.
41. Groopman, J.E., Molina, J.M., Scadden, D.T., (1989), Hematopoietic growth factors. Biology and clinical applications. *N Engl J Med*, 321: 1449-59.

42. Gruhn, B., Hafer, R., Muller, A., Andra, W., Danan, H., Zintl, F., (1991), Model experiments for immunomagnetic elimination of leukemic cells from human bone marrow. Presentation of a novel magnetic separation system. *Immunobiology*, 183: 374-85.
43. Gulati, S., Yahalom, J., Acaba, L., Reich, L., Motzer, R., Crown, J., Toia, M., Igarashi, T., Lemoli, R., Hanninen, E., (1992), Treatment of patients with relapsed and resistant non-Hodgkin's lymphoma using total body irradiation, etoposide, and cyclophosphamide and autologous bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*, 10: 936-41.
44. Haas, R., Ho, A.D., Bredthauer, U., Cayeux, S., Egerer, G., Knauf, W., Hunstein, W., (1990), Successful autologous transplantation of blood stem cells mobilized with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Exp Hematol*, 18: 94-8.
45. Harris, D.T., Schuhmacher, M.J., Rychlik, S., Booth, A., Acevedo, A., Rubinstein, P., Bard, J., Boyse, E.A., (1994), Collection, separation and cryoconservation of umbilical cord blood for use in transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 13: 135-43.
46. Hongeng, S., Krance, R.A., Bowman, L.C., Srivastava, D.K., Cunningham, J.M., Horwitz, E.M., Brenner, M.K., Heslop, H.E., (1997), Outcomes of transplantation with matched-sibling and unrelated-donor bone marrow in children with leukaemia. *Lancet*, 350: 767-771.
47. Kersey, J.H., Weisdorf, D., Nesbit, M.E., LeBien, T.W., Woods, W.G., McGlave, P.B., Kim, T., Vallera, D.A., Goldman, A.I., Bostrom, B., (1987), Comparison of autologous and allogeneic bone marrow transplantation for treatment of high-risk refractory acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 317: 461-7.
48. Kernan, N.A., Bartsch, G., Ash, R.C., Beatty, P.G., Champlin, R., Filipovich, A., Gajewski, J., Hansen, J.A., Henslee-Downey, J., McCullough, J., (1993), Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the National Marrow Donor Program. *N Engl J Med*, 328: 593-602.

49. Kessinger, A, Armitage, J.O., (1991), The evolving role of autologous peripheral stem cell transplantation following high-dose therapy for malignancies. *Blood*, 77: 211-3.
50. Kobylka, P., Ivanyi, P., Breur-Vriesendorp, B.S., (1998), Preservation of immunological and colony-forming capacities of long-term (15 years) cryopreserved cord blood cells. *Transplantation*, 65: 1275-8.
51. Kogler, G., Callejas, J., Sorg, R.V., Fischer, J., Migliaccio, A.R., Wernet, P., (1998), The effect of different thawing methods, growth factor combinations and media of the ex vivo expansion of umbilical cord blood primitive and committed progenitors. *Bone Marrow Transplant*, 21: 233-2341.
52. Kogler, G., Somville, T., Göbel, U., Hakenberg, P., Knipper, A., Fishcer, J., Adams, O., Krempe, C., McKenzie, C., Rüttgers, H., Meier, W., Bellmann, O., Streng, H., Ring, A., Rosseck, U., Rocha, V., Wernet, P., (1999), Haematopoietic transplant potential of unrelated and related cord blood: the first six years of the EUROCORD/NETCORD Bank Germany. *Klin Padiatr*, 211: 224-232.
53. Korbling, M., Dorken, B., Ho, A.D., Pezzutto, A., Hunstein, W., Fliedner, T.M., (1986), Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. *Blood*, 67: 529-32.
54. Kurtzberg, J., Laughlin, M., Graham, M.L., Smith, C., Olson, J.F., Halperin, E.C., Ciocchi, G., Carrier, C., Stevens, C.E., Rubinstein, P., (1996), Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Eng J Med*, 335: 157-166.
55. Kvalheim, G., Sorensen, O., Fodstad, O., Funderud, S., Kiesel, S., Dorken, B., Nustad, K., Jakobsen, E., Ugelstad, J., Pihl, A., (1988), Immunomagnetic removal of B-lymphoma cells from human bone marrow: a procedure for clinical use. *Bone Marrow Transplant*, 3: 31-41.

56. Lohrmann, H.P., Schreml, W., Lang, M., Betzler, M., Flieder, T.M., Heimpel, H., (1978), Changes of granulopoiesis during and after adjuvant chemotherapy of breast cancer. *Br J Haematol*, 40: 369-81.
57. Lowry, P.A., Tabbara, I.A., (1992), Peripheral haematopoietic stem cell transplantation: current concepts. *Exp Hematol*, 20: 937-42.
58. Li, K., Yau, F.W., Fok, T.F., So, K.W., Li, C.K., Yuen, P.M., (2001), Haematopoietic stem and progenitor cells in human term and preterm neonatal blood. *Vox Sang* 80: 162-169.
59. Mueller-Eckhardt, C., Kiefel, V., *Transfusionsmedizin (3. Auflage)*. Springer-Verlag, Gießen und Rostock, 2003, 273- 293
60. M-Reboredo, N., Diaz, A., Castro, A., Villaescusa, R.G., (2000), Collection, processing and cryopreservation of umbilical cord blood for unrelated transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 26: 1263-1270.
61. Mugishima, H., Harada, K., Chin, M., Suzuki, T., Takagi, K., Hayakawa, S., Sato, K., Klein, J.P., Gale, R.P., (1999), Effects of long-term cryopreservation on hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant*, 23: 395-6.
62. Ordemann, R., Petzold, K., Hölig, K., Schaffer, B., Mauersberger, S., Ehninger, G., Ehming, G., (1999), Experiences of the Dresdner Cord Blood Bank, supported by the Deutsche Knochenmarkspenderdatei. *Semin Thromb Hemost*, 25: 575-578.
63. Peters, W.P., Rosner, G., Ross, M., Vredenburgh, J., Meisenberg, B., Gilbert, C., Kurtzberg, J., (1993), Comparative effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on priming peripheral blood progenitor cells for use with autologous bone marrow after high-dose chemotherapy. *Blood*, 81: 1709-19.
64. Phillips, G.L., Herzig, R.H., Lazarus, H.M., Fay, J.W., Wolff, S.N., Mill, W.B., Lin, H., Thomas, P.R., Glasgow, G.P., Shina, D.C., (1984), Treatment of resistant malignant

lymphoma with cyclophosphamide, total body irradiation, and transplantation of cryopreserved autologous marrow. *N Engl J Med*, 310: 1557-61.

65. Richman, C.M., Weiner, R.S., Yankee, R.A., (1976), Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood* 47: 1031-9.
66. Rocha, V., Cornish, J., Sievers, E.L., Filipovich, A., Locatelli, F., Peters, C., Remberger, M., Michel, G., Arcese, W., Dallorso, S., Tiedemann, K., Busca, A., Chan, K.W., Kato, S., Ortega, J., Vowels, M., Zander, A., Souillet, G., Oakill, A., Woolfrey, A., Pay, A.L., Green, A., Garnier, F., Ionescu, I., Wernet, P., Sirchia, G., Rubinstein, P., Chevret, S., Gluckman, E., (2001), Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukaemia. *Blood*, 97: 2962-71.
67. Rubinstein, P., Dobrila, L., Rosenfield, R.E., Adamson, J.W., Migliaccio, G., Migliaccio, A.R., Taylor, P.E., Stevens, C.E., (1995), Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 10119-22.
68. Rubinstein, P., Carrier, C., Scaradavou, A., Kurtzberg, J. Adamson, J., Migliaccio, A.R., Berkowitz, R.L., Cabbad, M., Dobrilla, N.L. Taylor, P.E., Rosenfield, R.E., Stevens, C.E., (1998), Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med*, 339: 1565-77.
69. Sanz, G.F., Saavedra, S., Planelles, D., Senent, L., Cervera, J., Barragán, E., Jiménez, C., Larrea, L., Martín, G., Martínez, J., Jarque, I., Moscardó, F., Plumé, G., Andreu, R., Regadera, A.I., García, I., Mollá, S., Solves, P., de La Rubia, J., Bolufer, P., Benlloch, L., Soler, M.A., Marty, M.L., Sanz, M.A., (2001), Standardized, unrelated donor cord blood transplantation in adults with hematologic malignancies. *Blood*, 98: 2332-8.
70. Serke, S., Beyer, J., Rick, O., Schwella, N., Meyer, O., Hildebrandt, M., Huhn, D., (1998), Analysis of CD34-expressing cells in clinical practice. *Vox Sang*, 74 Suppl 2: 469-75.

71. Shlebak, A.A., Marley, S.B., Roberts, I.A., Davidson, R.J., Goldman, J.M., Gordon, M.Y., (1999), Optimal timing for processing and cryopreservation of umbilical cord haematopoietic stem cells for clinical transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 23: 131-136.
72. Spangrude, G.J., Heimfeld, S., Weissman, I.L., (1988), Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, 241: 58-62.
73. Stiff, P.J. Morgu, A.J. Wittes, R.E., DeRisi, M.F., Clarkson, B.D., (1983), Quantification of the peripheral blood colony forming unit-culture rise following chemotherapy. Could leukocytaphereses replace bone marrow for autologous transplantation? *Transfusion*, 23: 500-3.
74. Stroncek, D.F., Fautsch, S.K., Lasky, L.C., Hurd, D.D., Ramsay, N.K., McCullough, J., (1991), Adverse reactions in patients transfused with cryopreserved marrow. *Transfusion*, 31: 521-6.
75. Surbek, D.V., Visca, E., Steinmann, C., Tichelli, A., Schatt, S., Hahn, S., Gratwohl, A., Holzgreve, W., (2000), Umbilical cord blood collection before placental delivery during cesarean delivery increases cord blood volume and nucleated cell number available for transplantation. *Am J Obstet Gynecol*, 183: 218-221.
76. Swanson, B.N., (1985), Medical use of dimethyl sulfoxide (DMSO). *Rev Clin Basic Pharm*, 5: 1-33.
77. Szmant, H.H., (1975), Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems. *Ann N Y Acad Sci*, 243: 20-3.
78. Teshima, T., Harada, M., Takamatsu, Y., Makino, K., Inaba, S., Akashi, K., Kondo, S., Tanaka, T., Ishii, E., Niho, Y., (1993), Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)-induced mobilization of circulating haematopoietic stem cells. *Br J Haematol*, 84: 570-3.
79. Thomas, E.D., (1991), Frontiers in bone marrow transplantation. *Blood Cells*, 17: 259-67.

80. To, L.B., Haylock, D.N., Kimber, R.J., Juttner, C.A., (1984), High levels in circulating haematopoietic stem cells in very early remission from acute non-lymphoblastic leukaemia and their collection and cryopreservation. *Br J Haematol*, 58: 399-410.
81. Trice, J.M., Pinals, R.S., (1985), Dimethyl sulfoxide: a review of its use in the rheumatic disorders. *Semin Arthritis Rheum*, 15(1): p. 45-60.
82. Tsang, K.S., Li, K., Huang, D.P., Wong, A.P., Leung, Y., Lau, T.T., Chang, A.M., Li, C.K., Fok, T.F., Yuen, P.M., (2001), Dextran sedimentation in a semi-closed system for the clinical banking of umbilical cord blood. *Transfusion*, 41(3): p. 344-52.
83. Wagner, J.E., Kernan, N.A., Steinbuch, B., Broxmeyer, H.E., Gluckman, E., (1995), Allogenic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet* 236: 214-219.
84. Wong, G.G., Witek, J.S., Temple, P.A., Wilkens, K.M., Leary, A.C., Luxenberg, D.P., Lones, S.S., Brown, E.L., Kay, R.M., Orr, E.C., (1985), Human GM-CSF: molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. *Science*, 228: 810-5.
85. Wong, A., Yuen, P.M., Li, K., Yu, A.L., Tsoi, W.C., (2001), Cord blood collection before and after placental delivery: levels of nucleated cells, haematopoietic progenitor cells, leukocyte subpopulations and macroscopic clots. *Bone Marrow Transplant*, 27: 133-138.
86. Yang, H., Acker, J.P., Abley, D., McGann, L.E., Akabutu, J., (2001), High-efficiency volume reduction of cord blood using pentastarch. *Bone Marrow Transplant*, 27: 457-461.
87. Zingsem, J., Zeiler, T., Zimmermann, R., Weisbach, V., Mitschulat, H., Schmid, H., Beyer, J., Siegert, W., Eckstein, R., (1993), Automated processing of human bone marrow grafts for transplantation. *Vox Sang*, 65: 293-9.

88. Zingsem, J. Strasser, E., Weisbach, V., Zimmermann, R., Ringwald, J., Goecke, T., Beckmann, M.W., Eckstein, R., (2003), Cord blood processing with an automated and functionally closed system. *Transfusion*, 43: 806-13.

89. Zsebo, K.M., Cohen, A.M., Murdoch, D.C., Boone, T.C., Inoue, H., Chazin, V.R., Hines, D., Souza, L.M., (1986), Recombinant human granulocyte colony stimulating factor: molecular and biological characterization. *Immunobiology*, 172: 175-84.

7. Abkürzungsverzeichnis

7-AAD:	7-Aminoactinomycin
BFU:	Burst Forming Units
BSZT:	Blutstammzelltransplantation
CD:	Cluster of Differentiation
CFU:	Colony – forming – unit
CFU-GEMM:	Granulozyten-, Erythrozyten-, Makrophagen- und Megakaryozyten colony forming units
CFU-GM	Colony-forming units granulocyte-macrophage
DMSO:	Dimethylsulfoxid
EK:	Erythrozytenkonzentrat
ERY:	Erythrozyten
FITC:	Fluoresceinisothiocyanat
FSC:	Foreward light Scatter
G-CSF:	Granulozyten koloniestimulierende Faktor
GM-CSF:	Granulozyten - Makrophagen koloniestimulierende Faktor
GMP:	Good Manufacturing Practice
GVHD:	Graft-versus-host disease
GvLR:	Graft-versus-Leukämie-Reaktion
HES:	Hydroxyethylstärke
HLA:	human leukocyte antigen
KG:	Körpergewicht
KM:	Knochenmark
KMT:	Knochenmarkstransplantation
LK:	Leukozytenkonzentrat
LPP:	Leukozytenarme Plasma
LRP:	Leukozytenreiche Plasma
MHC:	Humaner Haupthistokompatibilitätskomplex
MNC:	Mononukläre Zellen
NC:	Nucleated cells
NSB:	Nabelschnurblut

NSBT:	Nabelschnurbluttransplantation
PBS:	Peripheral Blood Stem Cells
PE:	Phycoerythrin
PerCP:	Peridin Chlorophyll Protein
PRB:	Plazenta Restblut
SSC:	Sideward light Scatter
THR:	Thrombozyten
VB:	Vollblut
WBC:	Leukozyten

8. Danksagung

Herrn PD Dr. med. J. Zingsem danke ich für die Anleitung und die Unterstützung während meiner wissenschaftlichen Tätigkeit sowie die Beratung in der PRB-Bank.

Herrn Prof. Dr. med. R. Eckstein danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit in seiner Abteilung.

Ferner möchte ich den Mitarbeiterinnen der PRB-Bank meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Mein ganz besonderer Dank geht an Victoria Wilberg sowie an meine Familie für ihre lange seelische und moralische Unterstützung und aufmunternden Worte während meiner gesamten Studiums – und Assistenzarztzeit.

In memorem: Aufrichtigen Dank an meinen Opa Dr. med. K.-H. Sprügel, der mein Interesse an der Medizin geweckt hat und mir bis zu seinem Tod während meines Studiums ein wichtiger „Herr Kollege“ gewesen ist. Dank auch an meine Oma A. Sprügel für ihre großzügige Unterstützung während meines gesamten Medizinstudiums.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Moritz Krätzer

Geboren am: 05.02.1979 in München
Vater: Karl-Heinz Krätzer, Diakon i.R.
Mutter: Dorothee Krätzer, geb. Sprügel, Freie Journalistin
Familienstand: ledig

Berufliche Erfahrungen

Seit 01/2009 Assistenzarzt in der Abteilung für Unfallchirurgie Dr. med. Haselhuhn (Kliniken Dr. Erler)
05/2008 – 12/2008 Assistenzarzt in der Abteilung für konservative und Operative Wirbelsäulentherapie bei PD. Dr. med. Böhm (Kliniken Dr. Erler)
08/2007 – 04/2008 Assistenzarzt für Orthopädie und Unfallchirurgie im Krankenhaus Rummelsberg (Wichernhaus) bei Prof. Dr. med. Ascherl

Ausbildungsdaten

04/2001 - 06/2007 Medizinstudium an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen/ Nürnberg
09/1999 – 09/2000 Zivildienst im Krankenhaus Rummelsberg mit Ausbildung zum Krankenpflegehelfer
09/1989 - 06/1999 Katharinen Gymnasium Ingolstadt, Abschluss: Abitur
04/1995 Jugendleiter der evangelischen Jugend im Dekanat Ingolstadt