

**Bestimmung der Absolutzahl von Lymphozytensubtypen im peripheren Blut –  
Evaluation der Objektträger-basierten Zytometrie**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Carl Diedrich Schlenkhoff  
aus Herne

2008

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. Andreas Gerstner

2. Gutachter: Prof. Dr. Percy Knolle

Tag der Mündlichen Prüfung: 20.06.2008

Universitätsklinikum Bonn

Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde/Chirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Friedrich Bootz

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1) EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
<b>1.1 DIE IMMUNABWEHR</b>	<b>5</b>
1.1.1 LYMPHOZYTEN-SUBPOPULATIONEN UND IHRE EIGENSCHAFTEN	7
1.1.2 CD4 <sup>+</sup> UND CD8 <sup>+</sup> LYMPHOZYTEN IN IHRER KLINISCHEN ANWENDUNG	11
<b>1.2 IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG</b>	<b>14</b>
1.2.1 DAS DURCHFLUSSZYTOMETER (FCM)	17
1.2.2 DAS LASER-SCANNING-CYTOMETER (LSC)	18
1.2.3 WEITERE METHODEN DER ZELLZÄHLUNG UND -DIFFERENZIERUNG	19
<b>2) MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>22</b>
<b>2.1 MATERIALIEN</b>	<b>22</b>
2.1.1 PATIENTEN-BLUT	22
2.1.2 REAGENZIEN	22
2.1.3. GERÄTE	23
<b>2.2 METHODEN DER DATENGEWINNUNG</b>	<b>23</b>
2.2.1 PROBENGEWINNUNG UND -VERARBEITUNG	23
<b>2.2.2 HARDWAREKONFIGURATION</b>	<b>26</b>
2.2.3 SOFTWAREKONFIGURATION	27
<b>2.3 METHODEN DER STATISTISCHEN AUSWERTUNG</b>	<b>29</b>
2.3.1 REGRESSIONSANALYSE	29
2.3.2 KORRELATION $r$ UND BESTIMMTHEITSMASS $R^2$	30
2.3.3 BEISPIELE ZUR REGRESSIONSANALYSE UND KORRELATION	31
2.3.4 BLAND-ALTMAN-DIAGRAMM	33
<b>3) ERGEBNISSE</b>	<b>34</b>
<b>3.1 ERHOBENE DATEN UND KÜRZELERLÄUTERUNG</b>	<b>34</b>
<b>3.2 VERGLEICH DER LEUKOZYTENZAHLEN</b>	<b>36</b>
<b>3.3 VERGLEICH DER LYMPHOZYTENZAHLEN</b>	<b>38</b>

<b>4) DISKUSSION</b>	<b>42</b>
<b>4.1 SCHLUSSFOLGERUNGEN AUS DEN ERGEBNISSEN</b>	<b>42</b>
<b>4.3 VOR- UND NACHTEILE DES LSC</b>	<b>49</b>
<b>4.4 TRIGGERN AUF DRAQ5™</b>	<b>55</b>
<b>4.5 PERSPEKTIVEN</b>	<b>59</b>
<b>5) ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>62</b>
<b>6) REGRESSIONSGERADEN UND BLAND-ALTMAN-DIAGRAMME</b>	<b>64</b>
<b>7) TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>69</b>
<b>8) ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>70</b>
<b>9) LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>73</b>

## **1) EINLEITUNG**

Im klinischen Alltag sind das kleine und das große Blutbild, auch Differentialblutbild genannt, ein Standardwerkzeug in der Diagnosestellung. Das kleine Blutbild beinhaltet u.a. die Bestimmung der Zellzahl der Erythrozyten, der Leukozyten und der Thrombozyten. Im großen Blutbild werden die Leukozyten weiter unterteilt in die Subpopulationen Lymphozyten, eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten sowie Makrophagen. Schon im Studium lernt der Medizinstudent die manuelle Differenzierung der verschiedenen Leukozyten-Subpopulationen mit Hilfe des Lichtmikroskops, wie sie von Rudolf Virchow 1858 beschrieben wurde.

Veränderungen der Zellzahlen sind in der medizinischen Diagnostik häufig von entscheidendem Interesse. Eine Erhöhung der Leukozyten-Zellzahl, auch Leukozytose genannt, spricht meist für eine Entzündung. Aber auch bei einer Leukämie sind häufig erhöhte Leukozyten-Zellzahlen zu erkennen. Dann sind jedoch bestimmte Leukozyten-Subpopulationen vermehrt oder verringert, an denen man unterschiedliche Leukämie-Formen unterscheiden kann (Germing et al., 2005). Diese vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Zählung der Leukozyten und ausgewählter Subpopulationen. Dazu wird ein Laser-Scanning-Cytometer (LSC) eingesetzt, welches eine semi-automatisierte Zellzählung ermöglicht.

### **1.1 DIE IMMUNABWEHR**

Seit der ersten Veröffentlichung über Zellulärpathologie durch Rudolf Virchow im Jahre 1858 mit der Beschreibung der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) und der unter dem Mikroskop sichtbaren Unterschiede hat sich im Verständnis über die Immunabwehr des Menschen viel getan. Man unterscheidet heute die Immunabwehr in eine antigen-spezifische Immunität, auch erworbene oder „adaptive“ Immunität genannt, und in eine antigen-unspezifische Immunität, die angeborene Immunität. Die antigen-unspezifische Immunität ist durch einfache Stimulationsmechanismen schneller als die antigen-spezifische Immunität. Als Antigene bezeichnet man Substanzen oder Zellbestandteile, die von einem Rezeptor im Körper als fremd erkannt werden können und so eine Immunantwort auslösen. Dieser Rezeptor kann an eine

Zelloberfläche gebunden sein, oder frei in der Gewebsflüssigkeit zwischen den Zellen oder in anderen Körperflüssigkeiten vorkommen.

Bei beiden Arten der Immunität unterscheidet man zwischen einem zellulären und einem humoralen Bestandteil (Tabelle 1). Die Gesamtheit der zellulären Elemente der Immunabwehr, die im Blut vorhanden sind, werden als Leukozyten bezeichnet. Die Leukozyten wurden von Virchow 1858 ihrem Aussehen nach unter dem Lichtmikroskop unterschieden in Lymphozyten, Monozyten und drei Arten von Granulozyten: neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten. In dieser Arbeit werden die Leukozyten und Lymphozyten-Subpopulationen bestimmt.

Humorale Elemente der Immunabwehr dienen v.a. der Kommunikation der zellulären Elemente der Immunabwehr. Hier spielen vor allem die Zytokine eine Rolle. Außerdem ermöglichen die humoralen Elemente eine Reaktion des die Immunzellen umgebenden Gewebes, wie z.B. Schwellung, Rötung, Überwärmung und Schmerz (klassische Entzündungszeichen). Weiterhin können durch die humoralen Elemente systemische Reaktionen ausgelöst werden, wie z.B. Fieber.

	<b>Antigen-unspezifische Immunität</b>	<b>Antigen-spezifische Immunität</b>
<b>humorale Elemente</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zytokine, z.B. Interleukin 1 und 6, TNF <math>\alpha</math></li> <li>• Akute Phase-Proteine</li> <li>• Interferon <math>\alpha</math></li> <li>• Alternatives Komplementsystem</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zytokine, z.B. Interleukin 2, 4 und 5</li> <li>• Interferon <math>\gamma</math></li> <li>• Immunglobuline (Antikörper)</li> </ul>
<b>zelluläre Elemente</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Phagozyten</li> <li>• Natural-Killer-Zellen</li> <li>• Eosinophile</li> <li>• Basophile</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T-Lymphozyten</li> <li>• B-Lymphozyten</li> </ul>

**Tabelle 1 Übersicht über das Immunsystem, unterteilt in Antigen-spezifische und –unspezifische Immunität, sowie humorale und zelluläre Elemente (nach Braun, 2004)**

### 1.1.1 LYMPHOZYTEN-SUBPOPULATIONEN UND IHRE EIGENSCHAFTEN

Die Lymphozyten konnte man erst mit der Erforschung der zellulären Immunologie in verschiedene Gruppen wie T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Natural-Killer-Zellen (NK-Zellen) unterscheiden. Diese sehen mikroskopisch nahezu identisch aus, haben aber immunologisch gesehen unterschiedliche Funktionen. Köhler und Milstein haben Ende der 70er Jahre maßgeblich ihrer weiteren Differenzierung beigetragen, indem es ihnen erstmals gelang, monoklonale Antikörper herzustellen (Köhler und Milestein, 1975). Antikörper, auch Immunglobuline genannt, sind Molekülstrukturen, die bestimmte Antigene erkennen und mit ihnen eine Bindung eingehen. Monoklonale Antikörper haben alle die gleiche Struktur, da sie alle von einer identischen Gensequenz abgelesen werden. Monoklonale Antikörper erlaubten es, Zell-Oberflächenstrukturen zu erkennen, heutzutage als *Clusters of Differentiation (CD)* bezeichnet. Anhand unterschiedlicher CDs kann man Zellfunktionen erkennen. CDs werden numerisch gekennzeichnet. Eine Zelle mit dem CD3-Rezeptor auf ihrer Oberfläche wird CD3-positiv ( $CD3^+$ ) bezeichnet, und ist funktionell ein Lymphozyt. Seit dem achten CD-Workshop 2004 sind nunmehr insgesamt 339 CD-Nummern vergeben (Wahn et al., 2005; Mason et al., 2001; Mason et al., 2002).

In dieser Arbeit werden die Lymphozyten anhand der molekularen Merkmale CD3, CD4 und CD8 untersucht. CD3 ist eine Zell-Oberflächenstruktur aller T-Lymphozyten, CD4 und CD8 sind Zell-Oberflächenstrukturen, die die Zusammenarbeit der T-Lymphozyten mit dem HLA-System anderer immunologisch aktiver Zellen ermöglichen (siehe unten). In Tabelle 2 wird eine Übersicht ausgewählter Lymphozyten und ihrer typischen Oberflächenrezeptoren gegeben. Es konnten zwar auch beispielsweise CD3-Oberflächenmarker auf NK-Zellen ( $CD16/56^+$ ) nachgewiesen werden, dies stellt aber in der praktischen Anwendung kein Problem dar (Gruber, 2007). Die Summe der Lymphozytenpopulationen der  $CD3^+$ ,  $CD19^+$  und  $CD16/56^+$  Zellen sollte 100% ergeben. Ebenso sollte die Summe der  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Zellen den  $CD3^+$  Zellen entsprechen (Gruber, 2007).

Zelltyp	Oberflächenmarker
T-Lymphozyten <ul style="list-style-type: none"> <li>• zytotoxische T-Zellen</li> <li>• T-Helferzellen</li> <li>• regulatorische T-Zellen (früher: T-Supressorzellen)</li> <li>• Gedächtniszellen</li> </ul>	CD3 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , CD 25 <sup>+</sup>  CD 45RO <sup>+</sup>
B-Lymphozyten	CD19 <sup>+</sup> , CD 20 <sup>+</sup>
NK-Zellen	CD16 <sup>+</sup> , CD56 <sup>+</sup>

**Tabelle 2 Lymphozyten-Subpopulationen und typische Oberflächenmarker zur Immunsotypisierung (nach Braun, 2004)**

HLA bedeutet *human leukocyte antigen* und ist als Zell-Oberflächenstruktur auf allen kernhaltigen Körperzellen vorhanden. Die meisten Zellen im Körper sind kernhaltig. Ausnahme bilden die kernlosen reifen Erythrozyten, die immunologisch nicht aktiv sind, wohl aber vom Immunsystem über das ABO-System und andere Blutgruppensysteme erkannt werden können. Genetisch sind die HLA-Moleküle im kurzen Arm von Chromosom 6 kodiert, im sog. *major histocompatibility complex (MHC)*. Häufig werden die Begriffe HLA- und MHC-Molekül auch synonym verwendet.

Man unterscheidet die HLA-Moleküle in zwei Klassen:

**Klasse-I-HLA-Moleküle:** Man unterscheidet drei Genloci: HLA-A, HLA-B und HLA-C. Sie werden auf allen kernhaltigen Zellen ständig exprimiert. Intrazellulär produzierte Proteine werden als Fragment, gebunden an das MHC-I-Molekül, nach extrazellulär präsentiert. In Interaktion mit den **CD8 positiven T-Lymphozyten (CD8<sup>+</sup>)**, auch zytotoxische T-Zellen genannt, wird nun dieses präsentierte Fragment des intrazellulären Proteins durch komplizierte intra- und interzellulären Vorgängen „beurteilt“ mit der Frage, ob eine Immunreaktion ausgelöst werden soll (siehe unten). So ist es dem Immunsystem möglich, körperfremde Proteine zu



erkennen, die in körpereigenen Zellen produziert werden. Dies spielt v.a. eine Rolle bei Virusbefall einer Zelle, bei einigen Bakterien und bei Tumorzellen.

**Klasse-II-HLA-Moleküle**: Man unterscheidet drei Genloci: HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP. Das HLA-II-System wird vor allem auf sog. antigenpräsentierenden Zellen wie Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten exprimiert. Nicht selten kommt es im Rahmen von Entzündungsreaktionen vorübergehend zur HLA-II-Molekül-Expression auch auf anderen Zellen. Präsentiert, d.h. gebunden an das HLA-II-Molekül, werden extrazelluläre Proteine, die durch Phagozytose aufgenommen und anschließend fragmentiert wurden. So werden z.B. Fragmente von extrazellulären Bakterien, Parasiten oder von anderen Zellen ausgeschüttete Viruspartikel präsentiert. In Interaktion mit den **CD4 positiven T-Lymphozyten (CD4<sup>+</sup>)**, auch T-Helferzellen genannt, wird dieses Antigen „beurteilt“, und evtl. eine Immunreaktion ausgelöst (Braun, 2004).

Bei der „Beurteilung“ der präsentierten Protein-Fragmente durch die T-Lymphozyten wird entschieden, ob eine Antigen-spezifische Immunantwort ausgelöst wird oder nicht. Mit Hilfe von Kostimulations-Signalen wird der naive T-Lymphozyt zu klonalem Wachstum gebracht und in aktivierte T-Lymphozyten umgewandelt. Zur gleichzeitigen Präsentation von Kostimulations-Signalen und Antigen-Präsentation sind nur Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten in der Lage (Carroll et al., 2001).

Man unterscheidet die Th<sub>1</sub>- von der Th<sub>2</sub>- Antwort der T-Helferzelle (CD4<sup>+</sup>). Die Kostimulations-Signale sind dabei entscheidend. Eine Th<sub>1</sub>-Antwort führt zur zellvermittelten Immunantwort: Makrophagenstimulierung, zytotoxischen T-Zell Stimulierung, IgG-vermittelte Reaktionen. Eine Th<sub>2</sub>-Antwort verursacht eine eher humorale bzw. allergische Immunantwort: Mastzell-Aktivierung, Eosinophilen-Rekrutierung, IgE-Produktion. Zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) ist es möglich, den programmierten Zelltod (Apoptose) der präsentierenden Zelle auszulösen oder diese durch enzymatische Perforation zu zerstören.

B-Lymphozyten präsentieren Antigene über das HLA-II-Molekül. Außerdem produzieren sie Immunglobuline (Ig). Ein B-Lymphozyt exprimiert transmembranös Immunglobuline, die zur Anheftung an Antigene führen, z.B. Viruspartikel. Dieses Antigen wird nun einer naiven T-Zelle präsentiert. Erkennt eine naive T-Zelle dieses Antigen als fremd und wird gleichzeitig von anderen Faktoren stimuliert (Kostimulation), wird die T-Zelle Faktoren ausschütten, die

wiederum den B-Lymphozyt stimulieren. Der B-Lymphozyt wird daraufhin anfangen zu proliferieren, sich zu teilen und sich in B-Memory-Zellen oder in B-Plasmazellen differenzieren. Als B-Plasmazelle ist er dann in der Lage, IgG auszuschütten, und so spezifische Antikörper gegen das zuvor dem T-Lymphozyt präsentierten Antigen zu bilden, z.B. Viruspartikel-Antikörper.

Eine weitere Gruppe der Lymphozyten sind die NK-Zellen. Diese können unspezifisch, d.h. ohne vorherige Aktivierung durch T-Lymphozyten oder Antikörper, virusinfizierte oder neoplastisch veränderte Zellen abtöten. Sie erkennen nur ein eingeschränktes Antigenrepertoire, lassen sich aber von opsonierten Zellen, d.h. vom humoralen Immunsystem markierten Zellen, aktivieren. Des weiteren töten sie Zellen, die zu wenig HLA-Klasse-I-Moleküle exprimieren. Sie sind somit ein wichtiger Bestandteil zur Bekämpfung von tumorösen und virusinfizierten Zellen. Sie sind durch die einfache Aktivierung innerhalb von Minuten einsatzbereit, wohingegen eine zytotoxische Zelle (CD8<sup>+</sup>) viel länger bis zur Aktivierung braucht (Braun, 2004).

**T-Zell-Entwicklung:** T-Zellen stammen von pluripotenten Stammzellen ab, die von den primären lymphatischen Organen (fötale Leber und Knochenmark) in den Thymus migrieren, wo sie sich zu funktionellen, reifen T-Zellen entwickeln. Während der Entwicklung werden mehrere Entwicklungsstadien durchlaufen, die sich anhand von intrazellulär und auf der Zelloberfläche exprimierten Markern (CDs) definieren lassen (Macey, 2001). Die Mehrzahl der T-Zellen im Thymus ist, im Gegensatz zu den reifen T-Zellen im peripheren Blut, „doppelt positiv“, d.h. sie exprimieren sowohl CD4 als auch CD8. Reife T-Zellen exprimieren immer nur CD4 oder CD8 (Gruber, 2007).

**Der Aktivierungszustand** der Zellen kann über die verschiedenen Oberflächenmarker und Zytokine bestimmt werden. Veränderungen der T-Zell-Subpopulation spielen physiologisch (zirkardianer Rhythmus, Stress, körperliche Anstrengung, Alter, ethnische Zugehörigkeit, Medikamente, usw.), vor allem aber im Zusammenhang mit der Bewertung pathologischer Veränderungen, eine Rolle. Die unterschiedliche Verteilung der T-Zell-Subpopulationen in verschiedenen Geweben (gastrointestinal assoziiertes lymphatisches Gewebe (GALT), mukosaassoziiertes lymphatisches Gewebe (MALT), Milz usw.) und bei anderen Spezies ist vor allem für die Erforschung des Immunsystems interessant. Aktivierungsmarker bei CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten sind beispielsweise CD27, CD28 und CD57 (Gruber, 2007).

### 1.1.2 CD4<sup>+</sup> UND CD8<sup>+</sup> LYMPHOZYTEN IN IHRER KLINISCHEN ANWENDUNG

Das HI-Virus bindet mit seinem gp120 Hüllproteinen an den CD4-Rezeptor der Lymphozyten, was ihm die Zellinfiltration ermöglicht. Dort reguliert das HI-Virus die Expression von CD4- und Klasse-I-HLA-Molekülen an der Oberfläche der infizierten Zellen herunter (Daniel, 2007). So entgeht das HI-Virus dem Angriff der CD8<sup>+</sup>-Zellen, welche die HIV-Peptide ja nur über die Klasse-I-HLA-Moleküle erkennen können (Letvin und Walker, 2003; Stevenson, 2003). Das führt zum Untergang der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und schwächt so die T-Zell vermittelte Immunreaktion. In der modernen HIV-Therapie stellt die quantitative CD4<sup>+</sup>-Messung der Lymphozyten im peripheren Blut ein wichtiges Mittel zur Verlaufsdagnostik und zur Therapieentscheidung dar. Die **HIV-Infektion** wird in den Leitlinien der Deutschen Aids-Gesellschaft (DIAG) (Arastéh et al., 2006) anhand von drei Kriterien klassifiziert: Viruslast, klinische Symptome (definiert vom Center for Disease Control (CDC), Kategorie A bis C) und CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten im peripheren Blut.

Klinisch	CD4 <sup>+</sup> Zellen/ $\mu$ l	Viruslast	Therapiebeginn
CDC B, C	alle Werte	keine Angabe	eindeutige Empfehlung
CDC A	< 200	alle Werte	eindeutige Empfehlung
CDC A	200-350	alle Werte	im Allgemeinen ratsam
CDC A	350-500	>50.000 – 100.000	vertretbar
CDC A	350-500	<50.000	vertretbar
CDC A	>500	alle Werte	im Allgemeinen abzulehnen
Akutes retrovirales Syndrom	alle Werte	alle Werte	im Allgemeinen ratsam (bevorzugt in Studien)

**Tabelle 3 Indikationen zum Therapiebeginn bei HIV nach den Deutsch-Österreichischen Empfehlungen 2005, geordnet nach klinischen Kriterien, CD4<sup>+</sup>-Zellzahl und Viruslast (Arastéh et al., 2005; siehe auch Mellors et al., 1996; Centers for Disease Control, 1993)**

Je weniger CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten ein **HIV-infizierter Patient** hat, desto größer ist sein Risiko für opportunistische Erkrankungen. Bei Patienten mit <500/ $\mu$ l CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten sind Fieber,

Nachtschweiß und Gewichtsverlust häufige Symptome opportunistischer Infektionen und Tumoren (Kurowski, 2004). Ein Abfall auf  $<200/\mu\text{l}$   $\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten stellt ein deutlich erhöhtes Risiko für eine immunologische und klinische Progression dar, welche durch eine antiretrovirale Therapie vermindert werden kann (Chene et al., 2003). Der Anzahl von  $\text{CD4}^+$ -Lymphozyten im Blut kommt für die Entscheidung eines Therapiebeginns mit der sog. „highly active antiretroviral therapy“ (HAART) größere Bedeutung zu als der HI-Viruslast (Sterling et al., 2001). Nach Beginn der HAART geben  $\text{CD4}^+$ -Lymphozytenzahl und HIV-1-Viruslast größeren Aufschluss über den klinischen Verlauf des Patienten als einer dieser Parameter allein (Kitchen et al., 2001; HIV Surrogate Marker Collaborative Group, 2000).

In der **Hämatologie** spielen die Lymphozyten, aber auch die anderen Leukozyten-Subpopulationen, ebenfalls eine entscheidende Rolle (Germing et al., 2005). Die Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrischen Onkologie und Hämatologie (Schrapppe und Creutzig, 2005) empfiehlt beispielsweise, die Immunphänotypisierung der Leukozyten im Blut zur Differenzialdiagnostik der im Kindesalter vorkommenden Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) und der Akuten Myeloischen Leukämie (AML). Die Immunphänotypisierung ist für die Abgrenzung verschiedener ALL und AML-Subtypen relevant. Eine T-Vorläufer-Zell-ALL zeichnet sich durch  $\text{CD3}^+$ -Lymphozyten aus. Leukämiezellen, die sowohl lymphatische als auch myeloische Differenzierungsmerkmale aufweisen, werden derzeit durch die Koexpression von  $\text{CD2}$  und/oder  $\text{CD4}$  und/oder  $\text{CD7}$  und/oder  $\text{CD10}$  und/oder  $\text{CD19}$  auf  $\geq 20\%$  der myeloischen Blasten als AML definiert. Zellen mit Koexpression von bis zu zwei myeloischen Markern auf  $\geq 20\%$  der Leukämiezellen, typisch sind  $\text{CD13}$ ,  $\text{CD15}$ ,  $\text{CD33}$ ,  $\text{CD65}$ ,  $\text{CD66c}$ , werden derzeit der ALL zugerechnet.

Die Interdisziplinären Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (Garbe, 2005) empfehlen zur Diagnosestellung bei **kutanen Lymphomen** beim Verdacht auf ein Sézary-Syndrom u.a. die Bestimmung des  $\text{CD4/8}$ -Ratio und die Bestimmung der  $\text{CD4}^+/\text{CD7}^-$  Zellen im peripheren Blut. Das Sézary-Syndrom beginnt meist mit einer Erythrodermie, typischerweise mit Befall der Palmar- und Plantarfläche. Daneben finden sich leukämische Blutbildveränderungen und generalisierte Lymphknotenschwellung. Neben der morphologischen und molekularbiologischen Diagnostik stellt die Immunphänotypisierung ein drittes Standbein bei der Diagnosefindung. Unterstützend für die Diagnose eines Sézary-Syndroms ist ein  $\text{CD4/8}$ -Ratio  $> 10$  und  $\text{CD4}^+/\text{CD7}^-$ -T-Zellen  $> 40\%$

Die Leitlinien der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie (Freihorts, 1998) empfehlen zur Ursachenfindung bei der **Interstitiellen Lungenerkrankung** u.a. eine bronchoalveoläre Lavage (BAL). Ist eine Sarkoidose die Ursache der Interstitiellen Lungenerkrankung, so lässt sich bei der Lymphozyten-Typisierung in der Spülflüssigkeit eine erhöhte CD4/8-Ratio feststellen, und es sind vermehrt CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten nachweisbar (Prejcic et al., 2005).

In Tabelle 4 werden verschiedene Indikationen zur (absoluten) Lymphozyten-Subtypisierung, mit Angabe der Wertigkeit im klinischen Alltag, angegeben. Außerdem wird in speziellen Fällen der Liquor auf T-Zell-Subpopulationen untersucht.

<b>Indikation</b>	<b>Bestimmung</b>	<b>Wertigkeit</b>
HIV-Staging	absolute Zahl der CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten, CD4/CD8 Ratio	Referenzmethode, zum Teil Grundlage der Stadieneinteilung
Angeborene Immundefekte	Quantifizierung der T-/B-Zellen, B- Zell-Reifung	essentielle Untersuchung
Sarkoidose	CD4/CD8 Ratio in der BAL >3	wichtige Teildiagnostik
exogen allergische Alveolitis	CD4/CD8 Ratio in der BAL <1,5	wichtige Teildiagnostik
Leukämiediagnostik	Immunphänotypisierung	wichtiger Beitrag zur Klassifikation der Leukämien

**Tabelle 4 Indikationen zur Bestimmung von T-Lymphozyten-Subpopulationen und die Wertigkeit in der praktischen Anwendung (nach Gruber, 2007; siehe auch Sack et al., 2000)**

Die Immunphänotypisierung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> **in der Forschung** nimmt ein noch viel breiteres Spektrum ein. Watson et al. zeigten 1994 am Kaninchen und 1995 am Hund, dass sowohl die CD4<sup>+</sup>, als auch die CD8<sup>+</sup> Zellen für die Transplantatabstoßung essentiell sind. Dies wird auch schon als diagnostischer Marker der akuten Abstoßungsreaktion eingesetzt (Lun und Sack, 2007). Akabari entdeckte 2006 neue CD4<sup>+</sup>-NK-Zellen in Lungen von Asthmatikern, die bei Sarkoidose-Patienten nicht vorkommen. Cho et al. beschrieben 2003 eine Korrelation zwischen

der Prognose von Patienten mit Ösophagealen Plattenepithelkarzinomen und der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten-Zellzahl im Stroma und der Zahl der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Karzinom-Gewebe. Ropponen et al. geben 1997 die CD8<sup>+</sup>-Zell Invasion in das Tumorgewebe als einen verlässlichen prognostischen Indikator beim Kolorektalen Karzinom an. Griveas et al. entdecken 2006 signifikante Unterschiede bei Peritonealdialyse-Patienten mit und ohne Peritonitis, deren Lymphozyten im peripheren Blut und in der Peritonealflüssigkeit untersucht wurden. Hennerbichler et al. untersuchten 2003 periphere Blutzellen schwangerer Patientinnen als Möglichkeit zur noninvasiven pränatalen Diagnostik des ungeborenen Kindes. Man kann eine Vielzahl weiterer Untersuchungen aufzählen, die uns mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern Rückschlüsse auf die Immunantwort und die zellulären Vorgänge ziehen lassen, welche bei den meisten Krankheiten noch weitgehend ungeklärt sind.

## **1.2 IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG**

Um die Oberflächenstrukturen von Zellen zu untersuchen und so ihre immunologischen Eigenschaften zu erkennen, kann man sich verschiedener Hilfsmittel bedienen. Mit monoklonalen Antikörpern kann man gezielt Oberflächenstrukturen (CDs) markieren. Von verschiedenen Firmen sind monoklonale Antikörper auf dem Markt, die mit Fluorochromen konjugiert sind. Fluorochrome haben folgende Eigenschaft: Wenn sie mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angestrahlt werden, leuchten sie in einer anderen Farbe zurück. Zum „Anstrahlen“ kann beispielsweise Licht der Wellenlänge 488nm aus einem Argon-Laser verwendet werden, der blaues Licht emittiert, die sog. Exzitationswellenlänge. Ein Helium-Neon-Laser (HeNe-Laser) emittiert Licht der Wellenlänge 633nm. So gibt es eine Reihe weiterer Laser mit definierten Wellenlängen.

Wird beispielsweise das Fluorochrom FITC (Caltag; Burlingame, CA, USA) mit einer Wellenlänge von 488nm, blauem Licht, angestrahlt, so wird das Fluorochrom angeregt und emittiert Licht, hauptsächlich in der Wellenlänge 525nm, grünem Licht (peak emission). Werden andere Fluorochrome mit dem selben Argon-Laser angeregt, können sie Licht in einer anderen Wellenlänge emittieren, wie aus Tabelle 3 ersichtlich wird. So ist die Emissionswellenlänge des Fluorochroms Alexa 488 (Caltag) hauptsächlich hellgrünes Licht (519 nm), die des Fluorochroms R-PE (Caltag) hauptsächlich gelb/rotes Licht (575 nm) und die des Fluorochroms PE-Cy5

(Caltag) hauptsächlich tiefrotes Licht (670nm). Werden die gleichen Fluorochrome von einem HeNe-Laser angestrahlt, mit einer Wellenlänge von 633 nm, rotem Licht, so werden diese kaum angeregt, und leuchten nur schwach. Alternativ können auch Quecksilberdampf lampen eingesetzt werden (Gerstner et al., 2007).

<b>Fluorochrom-Name</b>	<b>Exzitation [nm]</b>	<b>Peak-Emission [nm]</b>
Alexa 488 <sup>1)</sup>	488 (blau)	519 (hellgrün)
FITC <sup>1)</sup>	488 (blau)	525 (grün)
R-PE <sup>1)</sup>	488 (blau)	575 (gelb/rot)
Tricolor (PE-Cy5) <sup>1)</sup>	488 (blau)	670 (tiefrot)
APC <sup>1)</sup>	633 (rot)	660 (tiefrot)
Draq5 <sup>TM 2)</sup>	633 (rot)	681-697 (tiefrot)

**Tabelle 5 Ausgewählte Fluorochrome mit Angabe der Exzitationswellenlänge und der Peak-Emission (Herstellerangaben: <sup>1)</sup>Caltag; Burlingame, CA, USA; <sup>2)</sup>Biostatus, Shepshed, GB)**

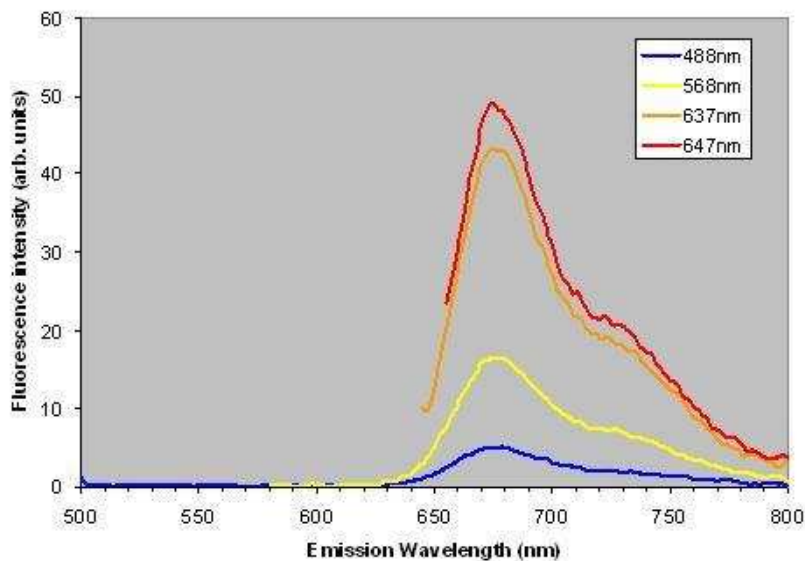
Sind nun Zellen, z.B. Lymphozyten, jeweils mit einem der vier oben genannten Fluorochromen konjugiert, und regt man diese Zellen mit einem Argon-Laser an, so leuchtet jede Zelle in der entsprechenden Farbe, hellgrün, grün, gelb, rot oder tiefrot, zurück. Um die Intensität der Fluoreszenz quantitativ auszuwerten, bedient man sich sog. Photomultiplier (PMT). Das ist ein Gerät, das aus Photonen einen elektrischen Impuls erzeugt und so ein digitales Ausgangssignal generiert. Die Detektion der Fluorochrome erfolgt als Messung des gesamten Spektrums, oder über Einsatz von Kombinationen aus dichroischen Spiegeln und Bandpass-Filtern. Solche Kombinationen werden so gewählt, dass sie aus dem Spektrum des emittierten Lichts schmale Bänder selektieren, die für die verwendeten Fluorochrome jeweils mehr oder weniger spezifisch sind (Gerstner et al., 2007).

Bedingt durch das Emissionsspektrum jedes einzelnen Fluorochroms, findet in vielen Fällen eine teilweise Überlappung der Spektren statt. Diese Überstrahlung wird als „Spillover“ bezeichnet (Schiemann und Busch, 2007). Dies erschwert die Kombination geeigneter Fluorochrome, kann aber auf Hardware- oder auf Software-Ebene teilweise herausgerechnet (kompensiert) werden.

Es gibt im wesentlichen zwei verschiedene Gerätetypen, die in der Lage sind, Fluorochrome anzuregen und zu detektieren: Durchflusszytometer (FCM) und Mikroskop-basierte Zytometer, wie z.B. das Laser-Scanning-Cytometer (LSC). Mit Hilfe von mit Fluorochrom konjugierten monoklonalen Antikörpern, z.B. CD3-R-PE, ist dann eine Immunphänotypisierung von Zellen möglich.

Biologische Systeme sind jedoch nicht immer so eindeutig, wie es die Mathematik beispielsweise ist. In Abbildung 1 kann man erkennen, dass das Fluorochrom Draq5<sup>TM</sup> zwar optimalerweise mit einem HeNe-Laser (633nm) angeregt wird, sich aber auch von einem Argon-Laser (488nm) anregen lässt. Dies erwähnen Smith et al. 2000 bei der Beschreibung dieses Fluorochroms als Vorteil.

Weiterhin werden bei Draq5<sup>TM</sup> nicht nur Emissionswellenlängen zwischen 681nm und 697 nm erzeugt. Auch bei Wellenlängen von 750nm ist noch eine Emission messbar. Dieses breite Emissionswellenlängen-Spektrum könnte zu Spillover-Effekten führen. Dies gilt es bei der Kombination der verschiedenen Fluorochrome miteinander zu berücksichtigen und kann in einigen Fällen auch online bei der Planung einer Fluorochrom-Kombination überprüft werden, z.B. unter <http://probes.invitrogen.com/resources/spectraviewer/>. Einen guten Überblick über Auswahl und Kombination von Fluoreszenzfarbstoffen, sowie über mögliche Störgröße bei der Fluoreszenz-Färbung, geben Schiemann und Busch (2007).



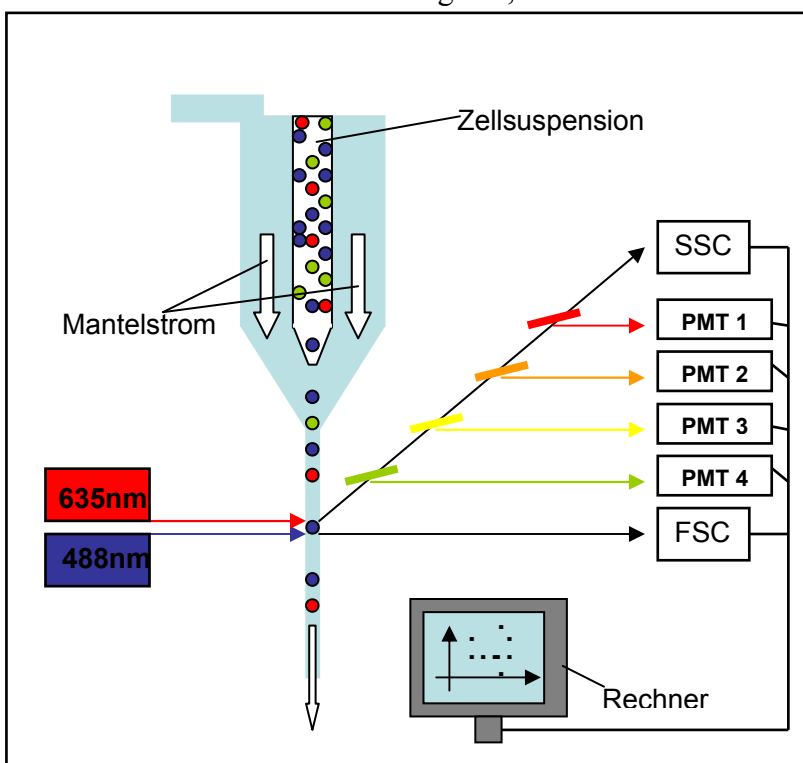
**Abbildung 1: Draq5<sup>TM</sup> -Emissionswellenlänge in Abhängigkeit von Exzitationswellenlängen** (Herstellerangaben: Biostatus, Shepshed, GB)



### 1.2.1 DAS DURCHFLUSSZYTOMETER (FCM)

Zur Qualitativen und Quantitativen Diagnostik der Immunvorgänge im Blut ist bisher die Durchflusszytometrie, im englisch Flow Cytometry (FCM), der Goldstandard. Sie ermöglicht eine multiparametrische Analyse sowie eine saubere Trennung verschiedener Zellpopulationen. Dadurch können viele verschiedene Charakteristika individuell oder in Kombination miteinander analysiert werden. Anhand dieser multiparametrischen Immunphänotypisierung wurde unter anderem entdeckt, dass bei der HIV-Erkrankung wesentliche Veränderungen innerhalb der Subpopulationen der zytotoxischen T-Lymphozyten stattfinden (Roederer et al., 1998).

Zu analysierende Zellen werden zuerst mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern inkubiert. Anschließend werden sie beim FCM als Suspension durch Überdruck in eine Messküvette eingeführt. Mittels eines Mantelstroms werden die Zellen einzeln hintereinander am Analysepunkt vorbeigeführt. Dort kreuzt ein Lichtstrahl den Flüssigkeitsstrom, und die Zellen werden anhand ihrer Streulichtsignale, dem Forward Scatter (FSC) und dem Sideward Scatter



(SSC), sowie der emittierten Fluoreszenzen analysiert (Abbildung 2). Der FSC hängt dabei hauptsächlich von der Zellgröße ab, der SSC vor allem von der Zelldichte und der Granularität. Die verschiedenen Fluorochrome können beispielsweise mit einem Argon- oder einem HeNe-Laser angeregt werden (Laffers, 2004).

**Abbildung 2** Durchflusszytometer-Schema mit Darstellung des Mantelstroms zur Zell-Separierung und Darstellung des Strahlenganges zur Zell-Analyse nach Inkubation

### 1.2.2 DAS LASER-SCANNING-CYTOMETER (LSC)

Ein LSC ist eine Kombination aus Mikroskop und FCM. Ein LSC kann Gewebe auf einem Objektträger mit Hilfe von Lasern, Fluorochrom konjugierten Antikörpern und Photomultipliern untersuchen. Der Objektträger, auf dem die Zellen immobilisiert sind, wird auf einem computergesteuertem motorisierten Objektstisch in der X- und Y-Achse bewegt. Dabei wird die Probe abwechselnd von zwei Lasern gescannt, einem Argon-Laser und einem HeNe-Laser, indem die Laserstrahlen über einen oszillierenden Scan-Spiegel geleitet werden. Durch dessen Bewegung entsteht eine Scan-Linie, die den Objektträger in der Y-Achse belichtet. Die Emissionen der angeregten Fluorochrome werden zu vier optischen Filtern geleitet, wo sie jeweils von einem Photomultiplier (PMT) elektronisch erkannt werden. Es werden digitale Ausgangssignale an den Computer übertragen. Zusätzlich wird die von den Zellen verursachte Lichtbrechung durch eine Linse und einen Kondensator zu einer Photodiode unter dem Objektstisch geleitet. Dieser Forward Scatter (FSC) gibt Aussagen über die Morphologie der Zellen. Eine zusätzliche Lichtquelle unter dem Objektstisch ermöglicht die konventionelle Durchlichtmikroskopie. Eine CCD-Kamera ermöglicht es, Fotos zu machen. Dies erlaubt es, die bei der automatisierten Immunfluoreszenz-Mikroskopie erfassten Objekte mit dem Auge nachzudifferenzieren. So fanden z.B. Bedner et al. (1999) heraus, dass sich eosinophile Granulozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC anfärben lassen, und es so zu Fehlinterpretationen kommen kann.

Bei entsprechender Konfiguration stehen so mit Hilfe von zwei Lasern (Argon-Laser mit 488 nm, HeNe-Laser mit 633 nm) bis zu sechs Fluorochrome zur Verfügung, mit denen man die Probe gleichzeitig anfärben kann (Gerstner et al., 2002). Neuere Methoden färben bei der Objektträger-basierten Zytometrie (slide-based Cytometry (SBC)) die Zellen mehrfach an und führen wiederholte Scanvorgänge durch, sog. iterative staining (Laffers et al., 2006; Mittag et al., 2006). So kann die Anzahl der Zellanalysen nahezu ins Unendliche gesteigert werden, sog. n-color immunphenotyping (Laffers et al., 2006). Das erste für die SBC einsetzbare Gerät ist das LSC (Tárnok et al., 2007), das zu Beginn der 1990er Jahre vorgestellt wurde und seit 1996 kommerziell erhältlich ist (Kamentsky und Kamentsky, 1991).

Man kann das LSC zur Analyse von festem Gewebe wie Darm (Liu et al., 2004), Gehirngewebe (Mosch et al., 2006) usw. benutzen, oder man fixiert flüssige Gewebsbestandteile auf dem

Objektträger (Laffers, 2004). Insgesamt spricht man von slide-based Cytometry (SBC) im Gegensatz zur Flow Cytometry (FCM) beim Durchflusszytometer.

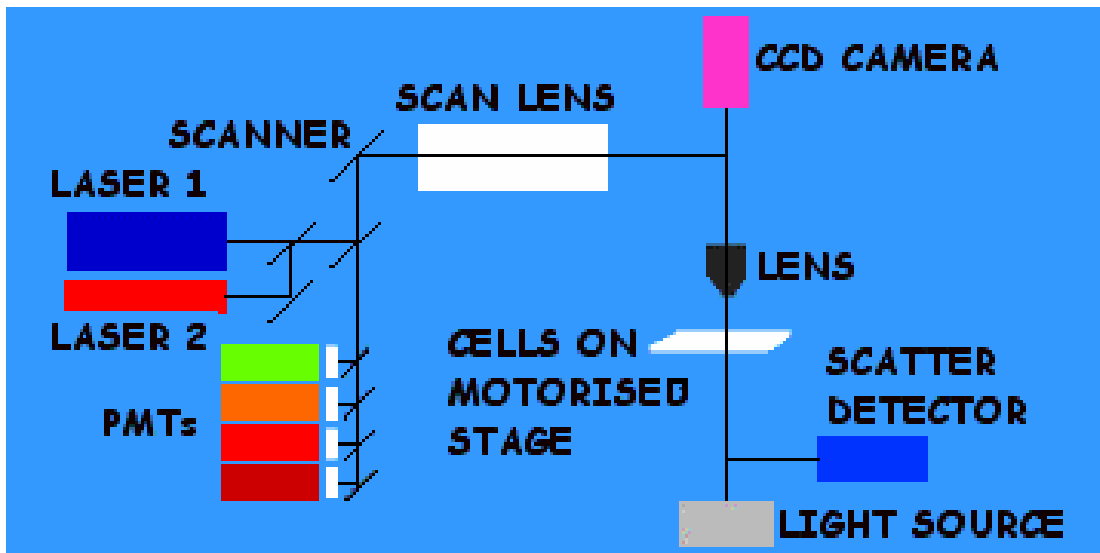


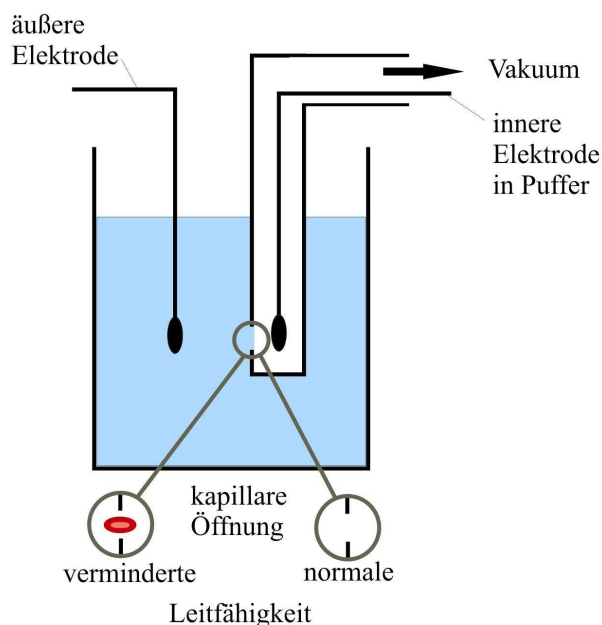
Abbildung 3 Strahlengang beim Laser-Scanning-Cytometer; zwei Laser zur Emission von Licht, zusammen mit vier PMTs und dem Scatter-Detektor dienen der automatischen Detektion; die manuelle Detektion wird mittels Lichtquelle und CCD-Camera oder dem menschlichen Auge ermöglicht (nach [http://science.cancerresearchuk.org/sci/facs/fac\\_labinfo/scanning\\_cytometry/](http://science.cancerresearchuk.org/sci/facs/fac_labinfo/scanning_cytometry/))

### 1.2.3 WEITERE METHODEN DER ZELLZÄHLUNG UND -DIFFERENZIERUNG

Die mikroskopische manuelle Differenzialblutanalyse mittels **Zählkammer** oder **Blutausstrich** sind die ältesten Methoden zur Leukozytenzählung, und werden heute noch regelmäßig im Laboralltag eingesetzt. Zur absoluten Zellzählung (z.B. 4500 Neutrophile Granulozyten/ $\mu\text{l}$ , 1000 Lymphozyten/ $\mu\text{l}$ ) wurden früher ausschließlich Zählkammern (z.B. nach Neubauer, Thoma, Türk, Bürker oder Schilling) eingesetzt (Abbildung 6). Ein Blutausstrich dagegen ermöglicht nur eine relative Zellzählung, d.h. ein Verhältnis der Leukozyten-Subpopulationen zueinander (z.B. 45% Neutrophile Granulozyten, 10% Lymphozyten usw.). Bei maschinell zweifelhaften Ergebnissen durch sehr niedrige Leukozytenpopulationen und zur Zellanalyse bei Leukämien wird noch heute die manuelle Differenzierung mit einer Zählkammer oder mit Hilfe eines Blutausstriches durchgeführt. Die Zählkammermethode zur Bestimmung der Zellzahlen unterliegt allerdings einem hohen Variationskoeffizient von  $> 10\%$  (Dörner, 2003). Darum wurden elektronische automatische Zählgeräte, sog. Hämatologie-Automaten, eingeführt, welche

statistisch sicherer und mit weniger investierter Arbeitszeit die Differenzialblutanalyse durchführen können.

Die heutigen Standardmethoden zur automatisierten Leukozytenzählung mittels Hämatologie-Automaten basieren auf dem Prinzip der Impedanzmessung und der Durchflusszytometrie. Bei der Impedanzmessung werden Zellen anhand der unterschiedlichen Leitfähigkeit gezählt und differenziert (Abbildung 4). Zwischen einer inneren und einer äußeren Elektrode fließt ein Strom, dessen Stärke u.a. durch die Größe der kapillären Öffnung im gläsernen Innenkörper und den Salzgehalt der Puffer-Lösung bestimmt wird. Eine Verdünnung aus Blut und Puffer-Lösung wird langsam durch eine kapilläre Öffnung gesaugt. Der Durchtritt einer Blutzelle durch die Öffnung bewirkt eine veränderte Leitfähigkeit, da Blutzellen eine geringere Leitfähigkeit als die sie



umgebende Puffer-Lösung haben. Große Zellen bewirken eine große Leitfähigkeitsänderung, kleinere Zellen eine kleine Änderung. Mit elektronischen Mitteln werden die einzelnen Impulse verstärkt und nach ihrer Größe sortiert und gezählt. Jeder Zellart werden bestimmte Schwellenwerte zugeordnet. So lassen sich Thrombozyten (Durchmesser: 2-4 $\mu\text{m}$ ), Erythrozyten (Durchmesser: 6,5-8 $\mu\text{m}$ ) und Leukozyten (Durchmesser: 6-20 $\mu\text{m}$ ) differenzieren und zählen. (Dörner, 2003; Wurzinger, 2002)

**Abbildung 4** Schematischer Aufbau eines Blutkörperchenzählers mit Impedanzmessung; veränderte Leitfähigkeit beim Durchtritt einer Zelle durch die kapilläre Öffnung (nach Dörner, 2003)

Die **Durchflusszytometrie** wurde bereits erläutert (Abbildung 2, Kap. 1.2.1). Hierbei wird ein Strom von Blutzellen hydrodynamisch fokussiert (Mantelstrom). Dieser Strom von einzelnen Zellen wird in einer Kapillare mit Hilfe eines oder zweier Lasers anhand ihrer Laserlichtabsorption (forward-scatter, FSC), Laserlichtstreuung (side-scatter, SSC) und anhand

der Depolarisation von Laserlicht differenziert (Dörner, 2003). Verwendet man Fluorochrome zur Zelldifferenzierung, so werden diese mit Hilfe der Photomultiplier (PMT) registriert. Der Sysmex XE-2100 (Sysmex, Kobe, Japan), der in dieser Arbeit als Referenzgerät herangezogen wurde, vereint Impedanzmessung und Durchflusszytometrie miteinander.

### **1.3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT**

Es soll eine neuen Methode überprüft werden, die es erlaubt, in einem Schritt (single platform) die absolute Zellzählung und die Zell-Subtypisierung im Blut durchzuführen.

Wir bedienen uns der slide-based Cytometry (SBC) und bringen Blutleukozyten auf einen Objektträger auf, einer Neubauer-Zählkammer, um dann mit einem Laser-Scanning-Cytometer (LSC; CompuCyte; Cambridge, MA, USA) die Immunphänotypisierung durchzuführen.

Zur Messung der Leukozyten-Subpopulationen wird heute routinemäßig die Durchflusszytometrie eingesetzt; es sind aber auch diverse andere Verfahren auf dem Markt (s. Kap. 4.5), die jedoch in der Routinediagnostik noch nicht Fuß fassen konnten.

In dieser Arbeit wird eine absolute Zellzählung der Leukozyten und Lymphozyten-Subpopulationen CD3, CD4 und CD8 mittels LSC durchgeführt. Das LSC ist ein im Routinelabor noch nicht etabliertes Gerät. Wir kombinieren hier somit die „alte Zählkammer“ mit dem „modernen LSC“.

Die Leukozyten werden anhand ihrer Zellkerne, die CD3, CD4 und CD8 Subpopulationen mit monoklonalen Antikörpern ausgezählt. Es wird geprüft, ob es möglich ist, mit diesem Verfahren zuverlässig absolute Zellzahlen der Leukozyten und ausgewählter Subpopulationen im Blut zu bestimmen. Die Lymphozyten-Subtypisierung wird bisher standardmäßig mit einem Durchflusszytometer (FCM) erledigt.

Als Vergleichsmethode bei der absoluten Leukozytenzählung wird ein Sysmex XE-2100 (Sysmex, Kobe, Japan) herangezogen.

## **2) MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 MATERIALIEN**

#### **2.1.1 PATIENTEN-BLUT**

In den Monaten März 2005 bis Dezember 2005 wurden 131 Patienten der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde/Chirurgie der Universität Bonn auf ihre Leukozyten und die Leukozyten-Subpopulationen untersucht. Das Blut von 119 Patienten konnte erfolgreich ausgewertet werden. Bei den verbleibenden 12 Patienten lagen v.a. methodische Fehler zugrunde (s. Kap. 4.3), welche die Zellzählung verhinderten. In der Regel wurden den Patienten bei Aufnahme während der routinemäßigen Blutentnahme ein zusätzliches EDTA-Blutröhrchen abgenommen.

Die Ethikkommission der Universität Bonn hat dem Forschungsprojekt zugestimmt.

In Tabelle 6 werden die Patienten in drei verschiedene Gruppen eingeteilt, je nach Pathologie. Alle Patienten wurden wegen einer anstehenden Operation in die HNO-Klinik aufgenommen.

<b>Anzahl gesamt</b>	<b>davon</b>		<b>Gruppendiagnosen</b>
	♀	♂	
30	12	18	Plattenepithel-Karzinome im Kopf-Hals-Bereich
47	31	16	benigne Erkrankungen (Septumdeviation, Halszysten, Tympanoplastik, chronische Sinusitis, chronische Tonsillitis, uva.)
42	20	22	andere Erkrankungen (Parotistumore, Tumor-Rezidive, Panendoskopien mit Probeentnahme, Halszysten, uva.)

**Tabelle 6 Aufschlüsselung der einbezogenen Patienten nach Geschlecht und Erkrankung**

#### **2.1.2 REAGENZIEN**

- a) Erythrozytenlysereagenz: Quicklysis<sup>TM</sup> Lysing Solution (Cytognos; Salamanca, Spanien)
- b) DNA-Färbung: Draq5<sup>TM</sup> (Alexis Corporation; Lausen, Schweiz)

c) Monoklonale Antikörper konjugiert mit Fluorochromen (Caltag; Burlingame, CA, USA):

- Human CD3 – R- Phytoerythrin (R-PE) Konjugat
- Human CD4 – Alexa 488 Konjugat
- Human CD8 – Tricolor (PE-Cy5) Konjugat

### 2.1.3. GERÄTE

- a) Pipetten (Eppendorf AG, Hamburg, BRD): 0,1-2,5µl, 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl
- b) Pipettenspitzen (Sarstedt; Nümbrecht, BRD): 10µl, 200µl, 1000µl
- c) Micro-Tubes (Sarstedt; Nümbrecht, BRD): 1,5ml
- d) Sysmex XE-2100 (Sysmex, Kobe, Japan)
- e) Laser-Scanning-Cytometer (LSC) mit Argon- und Helium-Neon-Laser (CompuCyte; Cambridge, MA, USA)
- f) WinCyte Version 3.7 (CompuCyte; Cambridge, MA, USA)
- g) Neubauer-Zählkammer (Brand GmbH+Co KG; Wertheim, BRD)

## **2.2 METHODEN DER DATENGEWINNUNG**

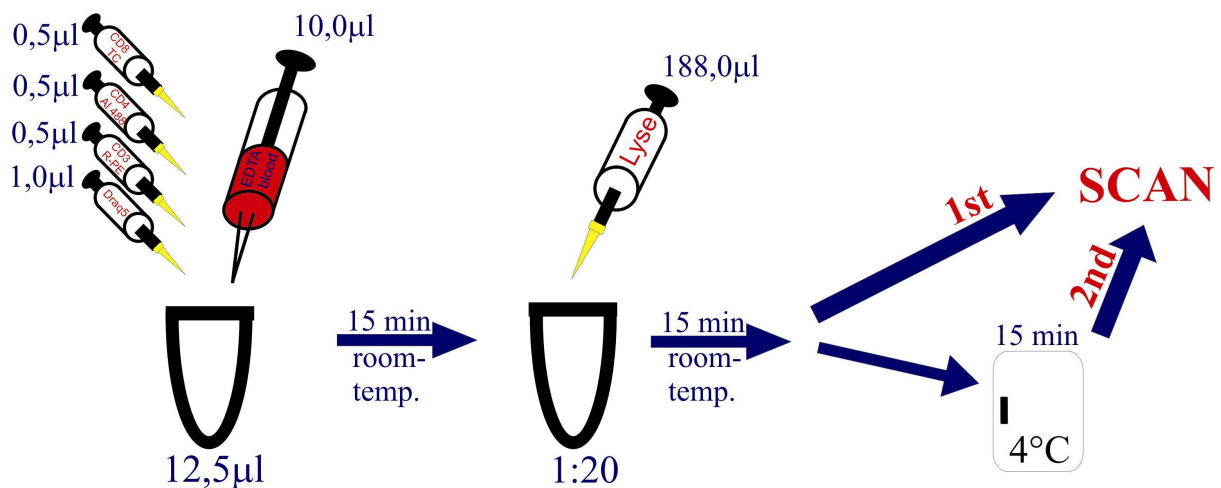
### **2.2.1 PROBENGEWINNUNG UND -VERARBEITUNG**

Bei allen Patienten wurde bei Klinikaufnahme zur routinemäßigen Blutabnahme ein zusätzliches EDTA-Blutröhrchen abgenommen. Die Routineblutabnahme erfolgte am späten Morgen, und innerhalb von acht Stunden wurde das Blut untersucht. Das Blut lagerte bis dahin, wie von McCoy (1998) empfohlen, bei Raumtemperatur.

Die Weiterverarbeitung des Blutes erfolgte nach einem standardisierten Schema (Abbildung 5), welches sehr streng eingehalten wurde. Es ergaben sich Zeitverzögerungen von höchstens 10 Minuten in der Verarbeitung der Proben.

Für jeden Ansatz wurden 1µl DraQ5<sup>TM</sup> und jeweils 0,5µl CD3-R-PE, CD4-Alexa 488 und CD8-Tricolor in ein Micro-Tube pipettiert. Dazu wurde jedes Mal die Pipettenspitze gewechselt. Das

EDTA-Blutröhrchen wurde gut durchmischt und die Pipettenspitze 3-4 mal im EDTA-Blutröhrchen aufgezogen und wieder entleert, um sicherzugehen, dass wirklich 10µl EDTA-Vollblut in das Micro-Tube pipettiert wurden. Der Ansatz wurde kurz geschüttelt, anschließend 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nun wurden 188µl Quicklysis™ hinzu gegeben, so dass sich ein Gesamtvolumen von 200,5µl ergab und das EDTA-Vollblut somit 1:20 verdünnt vorlag. Dies wurde wiederum 15 Minuten im Dunkeln inkubiert, um so die Erythrozyten zu lysieren. Da das Vollblut nicht zentrifugiert wird, um die Leukozyten von den übrigen Blutbestandteilen mit den eventuellen überflüssigen Fluoreszenz-Farbstoffen zu trennen, spart man sich einen aufwendigen Verarbeitungsschritt, der zusätzlich mit Verdünnungsfehlern behaftet sein kann. Somit liegt hier ein single-Platform Ansatz mit „lyse, no wash Methode“ zur Zellzählung vor.

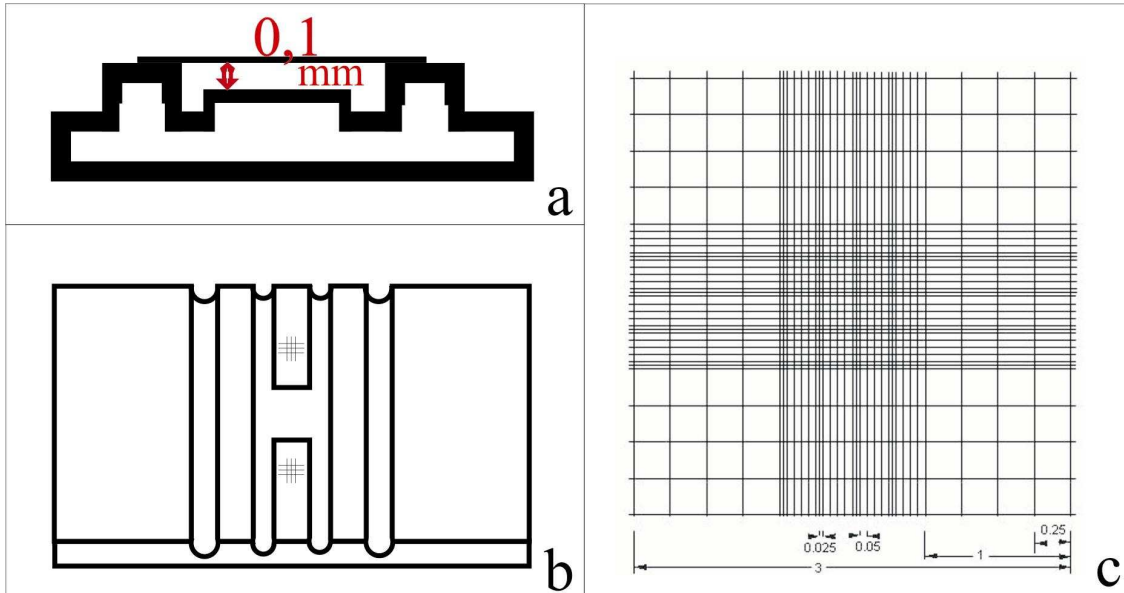


**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Weiterverarbeitungsvorganges des Patientenblutes; mischen und inkubieren mit Fluorochromen sowie mit Erythrozytenlyse-reagenz, anschließendes scannen mit dem LSC, bzw. zwischenlagern im Kühlschrank bei 4°C**

Eine Neubauer-Zählkammer besteht aus zwei Kammern, einer oberen und einer unteren, jede mit einer Fläche von 3mm x 3mm. In jede Kammer wurde nach Aufsetzen eines Deckgläschens der fertige Ansatz gegeben, und anschließend vom LSC ausgezählt. Um auf die Einheit Zellzahl/µl zu kommen, wurde die vom LSC ermittelte Zellzahl (ZZ) pro Kammer mit der endgültigen Verdünnung 20 multipliziert, und anschließend durch das analysierte Volumen pro Kammer, von 3mm Breite x 3mm Länge x 0,1 mm Höhe = 0,9mm<sup>3</sup> = 0,9 µl, geteilt:



$$\text{Zellen}/\mu\text{l} = \text{ZZ} \times 20 / 0,9 \mu\text{l}$$



**Abbildung 6 Neubauer-Zählkammer im Querschnitt, als Übersicht und in Detailvergrößerung** (a) Querschnitt mit aufgelegtem Deckgläschen (b) Ansicht von oben auf beide Kammern (c) Zeichnung der Gruppenquadrate einer Kammer, welche einmal oben und einmal unten in den Objektträger eingeschliffen ist

Ein Scanvorgang bei 20-facher Vergrößerung dauert ca. 15 Minuten. Nach dem ersten Scanvorgang wurde ein weiteres Aliquot des bereits gefärbten Ansatzes in eine weitere Neubauer-Zählkammer pipettiert, und vom LSC ausgezählt. Der Ansatz verblieb während des ersten Scanvorganges im Kühlschrank bei 4°C, um die lytische Wirkung der Quicklysis™ zu minimieren. So wurde versucht, auch beim zweiten Scanvorgang möglichst gleichbleibende Zellzahlen zu bestimmen.

Zusätzlich wurde zu jedem Patient die Leukozytenzahl des Routine-Labors notiert, um die mit dem LSC erhobenen Daten mit der bisherigen Routine-Diagnostik zu vergleichen. Im Routine-Labor wurde das Differentialblutbild mit einem Sysmex XE-2100 durchgeführt. Dieses Gerät hat sich in Evaluationsstudien als zuverlässig in seiner Funktion erwiesen (Walters und Garrity, 2000; Ruzicka et al., 2001).

## 2.2.2 HARDWAREKONFIGURATION

Die Messungen der Ansätze wurde mit einem Laser-Scanning-Cytometer (LSC) der Firma CompuCyte (Cambridge, MA, USA) durchgeführt. Das Gerät verfügte über zwei Laser, einem Argon-Ion-Laser mit einer Emission bei 488nm und einem Helium-Neon-Laser mit einer Emission bei 633nm. Die Fluoreszenz der Farbstoffe in der Neubauer-Zählkammer wurden mit vier verschiedenen optischen Filtern und dazugehörigen Photomultipliers (PMT) in Computersignale umgewandelt, welche mit Hilfe der zum LSC gehörigen CompuCyte-Software Version 3.7 (CompuCyte; Cambridge, MA, USA) analysiert wurde.

Folgende optische Filter wurden zur Messung der Fluoreszenz der entsprechenden Farbstoffe eingesetzt.

PMT	Filtername	Farbe	DRLP[nm]	Range[nm]	erkennbare Farbstoffe
#1	X	blau	HQ	463/30	NICHT EINGESETZT
#2	Cube D	grün	555	530/30	Alexa 488
#3	Cube J1	gelb	605	580/30	R-PE
#4	Cube H1	rot	full mirror	> 650	PE-Cy5; Draq5 <sup>TM</sup>

**Tabelle 7 Konfiguration der Photomultiplier (PMT), welche zur Analyse mittels LSC benutzt wurden; Reihenfolge von oben nach unten im LSC, entsprechend des Strahlenganges PMT #1 zuerst; jeweils mit Angabe der in dieser Studie verwendeten Farbstoffe, welche mit dem entsprechenden PMT erkannt wurden**

Es wurde auf das Signal der nukleären, doppelsträngigen DNA, die mit Draq5<sup>TM</sup> angefärbt wurde, getriggert, welches durch HeNe-Laser-Anregung auf PMT#4 gemessen wurde. Weitere Einstellungen waren wie folgt:

- Add Pixels to Threshold: 4
- Minimum Area: 10  $\mu\text{m}^2$
- Threshold: 2700
- Scans per Pixel: 1
- PMT: 45%
- Offset: 2073
- Gain: 255
- Dynamic Background Settings aktiviert

Vor jedem Scan wurden die Zellen in der Kammer unter dem Mikroskop fokussiert. Die Neubauer-Zählkammer wurde mit Einkerbungen an der Seite des Objektträgers fest auf dem Objektträgertisch eingespannt. Es wurden abwechselnd drei verschiedene Neubauer-Zählkammern benutzt, die entsprechend modifiziert waren. In der WinCyte-Software Version 3.7 wurde zur Verarbeitung der vom LSC erhobenen Daten eine Scan-Area definiert, die die zu scannende Fläche auf zwei Flächen eingrenzt, nämlich die obere und untere Kammer, von jeweils drei mal drei Millimetern. Diese Scan-Area musste dank der Einkerbungen an den Neubauer-Zählkammern während der Arbeit nur einmal pro benutzter Neubauer-Zählkammer eingerichtet werden, um immer wieder die vom Hersteller vorgegebenen obere und untere Kammer zu erkennen.

Die übrigen Fluorochrome wurden alle mit dem Argon-Laser angeregt. Die Leistung des Argon-Laser war auf 5mW eingestellt. Es wurden Alexa 488 auf PMT#2, R-PE auf PMT#3 und PE-Cy5 auf PMT#4 gemessen. Dynamic Background Settings waren immer aktiviert. Folgende Einstellungen wurden benutzt:

<u>CD3 – R-PE</u>	<u>CD4 – Alexa 488</u>	<u>CD8 – PE-Cy5</u>
• PMT: 60%	• PMT: 50%	• PMT: 50%
• Offset: 2098	• Offset: 1998	• Offset: 2073
• Gain: 255	• Gain: 255	• Gain: 255

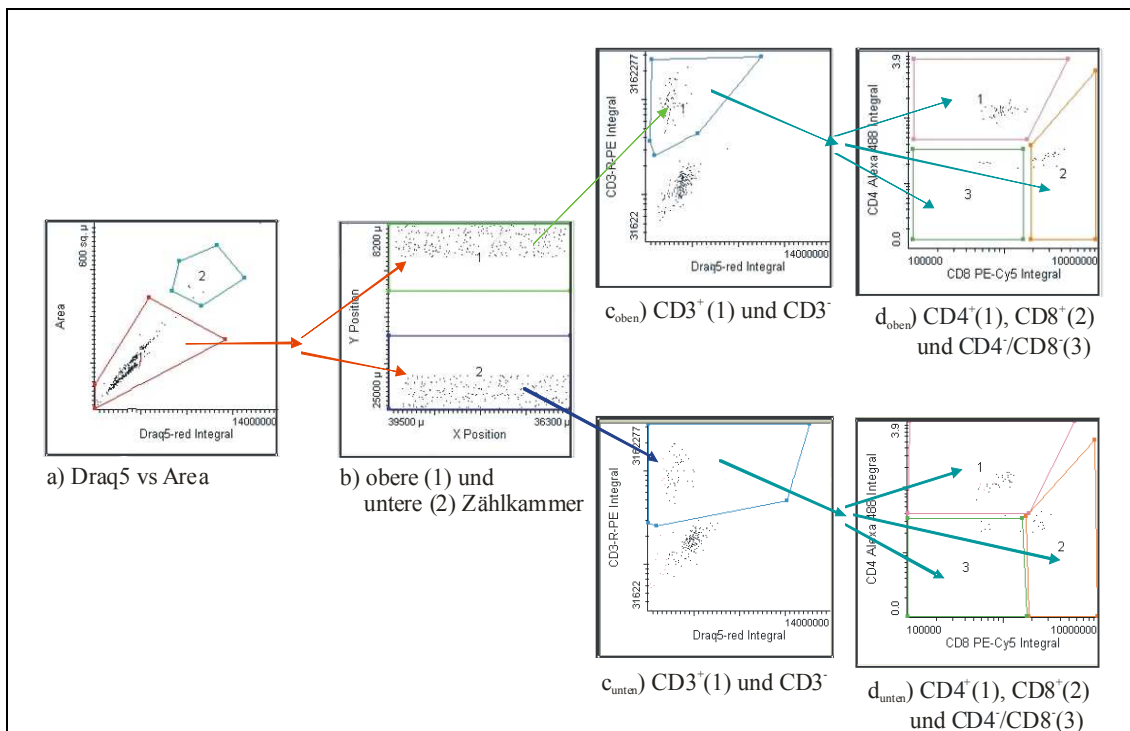
### 2.2.3 SOFTWAREKONFIGURATION

Die erhobenen Daten wurden im WinCyte Programm Version 3.7 in Punktwolken-Diagrammen dargestellt. Da durch die 15-minütige Einwirkung der Quicklysis™ die Erythrozyten lysiert wurden, sind im Ansatz nur noch Leukozyten vorhanden, deren DNA durch den DNA-Farbstoff Draq5™ angefärbt wurden.

Zur Draq5™ Darstellung wurde die integrale Helligkeit einer als Zelle erkannten Einheit linear aufgetragen. Die lineare Auftragung hat den Vorteil, dass zwei nahe beieinander liegende Zellen (Doubletten), die als eine Einheit erkannt werden, von den einzeln liegenden Zellen (Singletten) zu unterscheiden sind (siehe auch Kap. 4.2): zwei Zellen leuchten doppelt so hell und sind doppelt so groß wie eine einzelne Zellen, haben ein doppelt so großes Draq5-Integral wie

einzelne Zellen und sind in einem Diagramm Draq5-Area gegen Draq5-Integral rechts oben im Diagramm zu finden (Abbildung 7a). Die Integralwerte der Helligkeiten der anderen Fluoreszenz-Farbstoffe wurden logarithmisch aufgetragen.

Im Programm WinCyte Version 3.7 ist es möglich, sog. Regionen (regions) anzulegen und so eine bestimmte Zellpopulation zu markieren und zu selektieren, sog. gating. In einem ersten Schritt wurden die einzeln liegenden Zellen, in einem Diagramm Draq5-Area gegen Draq5-Integral, gegatet. Diese so selektionierten Zellen wurden anhand ihrer X- und Y-Position in obere und untere Kammer getrennt (Abbildung 7b). So war es möglich, die obere und untere Kammer der Neubauer-Zählkammern getrennt auszuwerten. Anschließend wurde das Draq5-Integral gegen das CD3-Integral aufgetragen. So kann man CD3 positive ( $CD3^+$ ) von CD3 negativen ( $CD3^-$ ) Zellen unterscheiden (Abbildung 7 c).  $CD3^+$  Zellen leuchten heller und haben somit auch ein höheres CD3-Integral als  $CD3^-$ -Zellen.  $CD3^+$ -Zellen entsprechen Lymphozyten und wurden nun im letzten Schritt in einem Diagramm CD4-Integral gegen CD8-Integral aufgetragen (Abbildung 7d). Hier kann man  $CD4^+$  und  $CD4^-$ , sowie  $CD8^+$  und  $CD8^-$  unterscheiden.



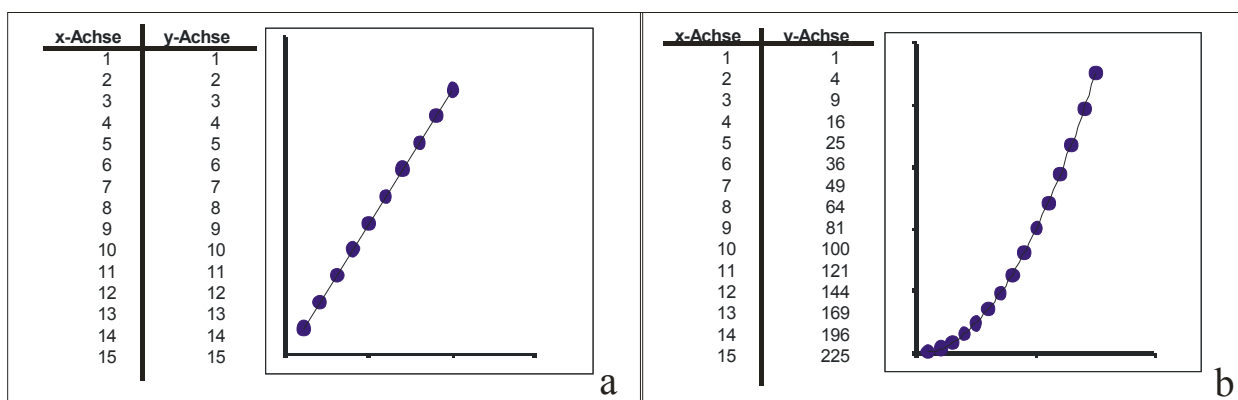
**Abbildung 7** Gang der Auswertung, nachdem die Signale von den PMTs zum Computer gesendet wurden; Zellzählung beginnend links mit a) Einzelzellseparierung, b) Aufteilung in obere und untere Kammer, c)  $CD3^+$ -Separierung und d)  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  und  $CD4^-/CD8^-$ -Separierung

## 2.3 METHODEN DER STATISTISCHEN AUSWERTUNG

Zum Vergleich der zwei Scans zum Zeitpunkt 15 Minuten und 30 Minuten, und zum Vergleich der oberen und der unteren Neubauer-Zählkammer, wurden in erster Linie Regressionsgeraden benutzt. Der p-Wert zur Überprüfung signifikanter Unterschiede wurde berechnet. Ebenso wurden Bland-Altman-Diagramme angefertigt. Bei dieser Darstellung kann man erkennen, ob sich bei steigender oder fallender Zellzahl die Messgenauigkeit verbessert oder verschlechtert. Keller (2007) betont, dass zur Darstellung der Ergebnisse jeweils adäquate statistische Verfahren angewendet werden sollen, insbesondere auch die am leichtesten nachvollziehbaren Verfahren, wozu ausdrücklich auch graphische, d.h. visualisierende Verfahren gehören. In dieser Arbeit wurden die Regressionsanalyse mit Korrelation  $r$  und Bestimmtheitsmaß  $R^2$  und Bland-Altman-Diagramme verwendet. Im Folgenden werden diese kurz erläutert.

### 2.3.1 REGRESSIONSANALYSE

Ein statistisches Werkzeug zur Überprüfung der Zuverlässigkeit einer Messmethode ist die Regressionsanalyse. In unserem Fall liegen lineare Funktionen vor, d.h. pro Zuwachs auf der x-Achse steigt der y-Wert im gleichen Ausmaß. Abzugrenzen sind exponentielle, quadratische und andere Funktionen.



**Abbildung 8** Unterschiedliche Funktionen der Regressionsanalyse; Darstellung von (a) linearem Zusammenhang, lineare Funktion und (b) exponentiellem Zusammenhang, quadratische Funktion

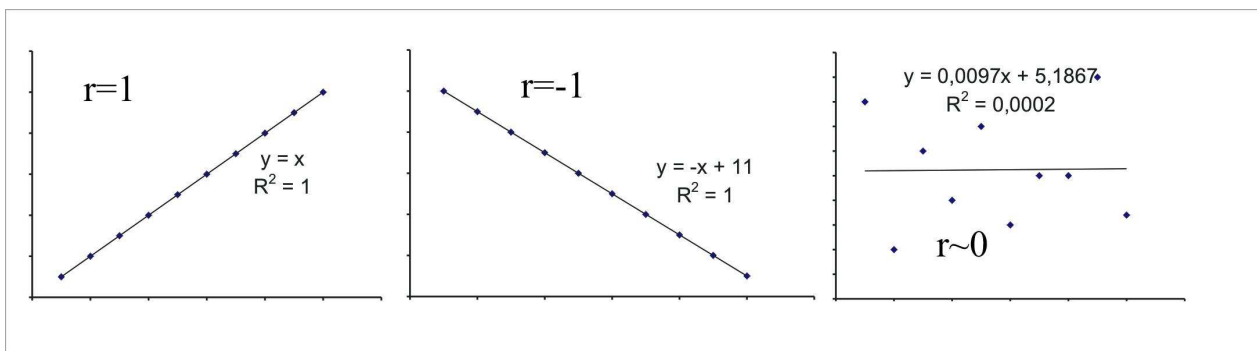
Die Formel einer Geraden ist üblicherweise  $y=mx+b$ . Die Steigung  $m$  gibt an, wie stark bei einer Zunahme auf der x-Achse die y-Achsen-Werte mitwachsen.  $b$  gibt den Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y-Achse an.

Die „Optimal-Formel“, die man bei den Messungen der Leukozyten und seiner Subpopulationen erreichen will, ist  $y=1x+0$ . Das würde heißen, dass man für jede Zelle mehr auf der x-Achse auch genau eine Zelle mehr auf der y-Achse hat ( $m=1$ ).

### 2.3.2 KORRELATION $r$ UND BESTIMMTHEITSMASS $R^2$

Weiterhin ist die Bestimmung der Korrelation  $r$  nach Brevais und Pearson interessant. Die Korrelation sagt aus, ob statistische Zusammenhänge bestehen: z.B. je mehr Leukozyten im Blut, desto mehr Lymphozyten sind im Blut = positive Korrelation; je mehr Granulozyten im Blut, desto weniger Bakterien im Blut = negative Korrelation. Eine Korrelation von  $+1$ , bzw.  $-1$  spricht für einen linearen Zusammenhang, eine Korrelation von  $0$  sollte dazu führen, von der Annahme eines linearen Zusammenhanges Abstand zu nehmen.

Keinesfalls kann eine Aussage über kausale Zusammenhänge getroffen werden. Dies bleibt immer noch Aufgabe des menschlichen Hirns. Dass Patienten mit niedrigen Leukozytenzahlen, z.B. bei Aids, besonders von Infektionen betroffen sind, darf nicht darauf schließen lassen, dass Patienten mit besonders hohen Leukozytenzahlen, z.B. bei akuter Leukämie, besonders immunkompetent sind. Von der Leukozytenzahl lässt sich nicht ohne weiteres auf den Immunstatus zurückschließen.



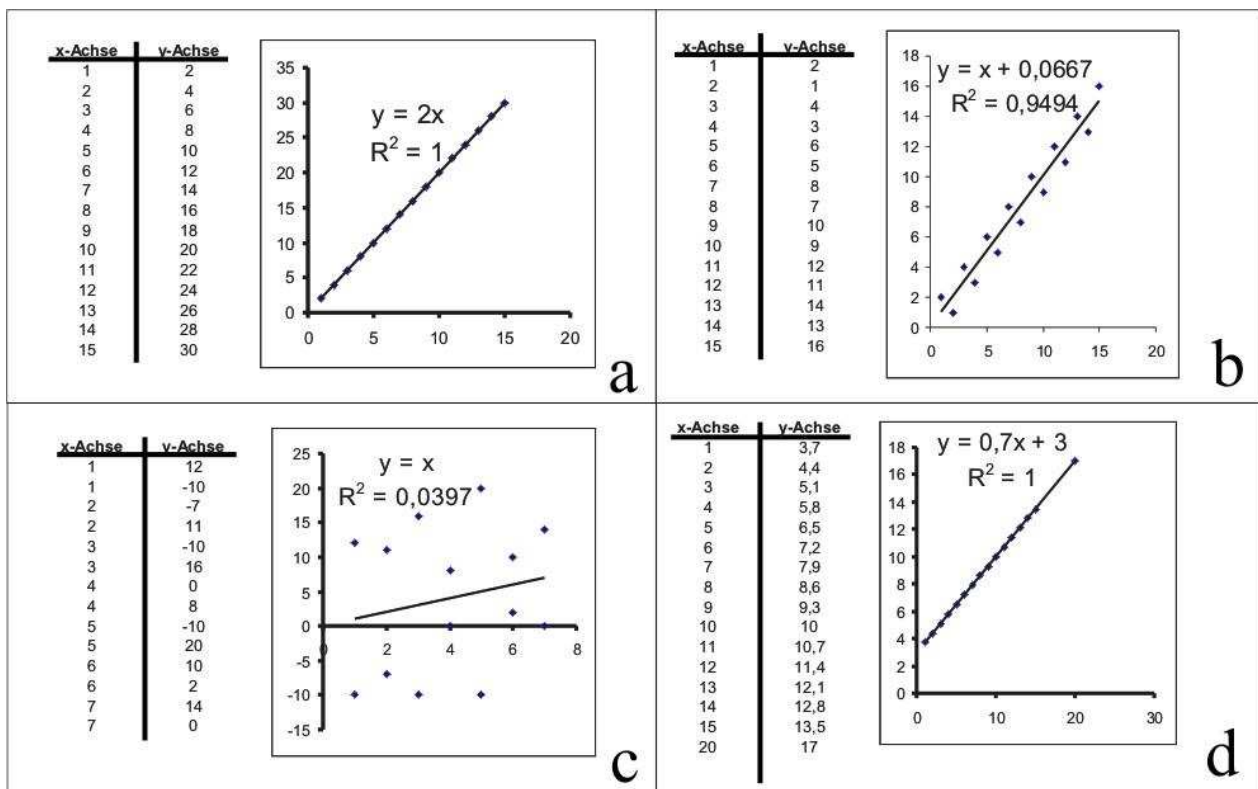
**Abbildung 9** Verschiedene Korrelationen einer Regressionsanalyse: positive Korrelation, negative Korrelation und keine Korrelation

Abhängig von der Korrelation  $r$  ist das Bestimmtheitsmaß  $R^2$ ; genauer gesagt ist  $R^2$  das Quadrat des Pearsons'schen Korrelationskoeffizienten  $r$ . Beträgt z.B. die Korrelation  $r=0,8$ , so ist das Bestimmtheitsmaß  $R^2=0,64$ .

Das Bestimmtheitsmaß ist ein Maß für den linearen Zusammenhang zweier Datensätze und die Qualität der Regressionsgeraden. Je näher  $R^2$  an 1 liegt, desto kleiner sind die Abstände der einzelnen Werte von der Regressionsgeraden.

### 2.3.3 BEISPIELE ZUR REGRESSIONSANALYSE UND KORRELATION

Zur Verdeutlichung werden hier einige Beispiele aufgeführt, um die Vorteile der einzelnen Parameter zu verdeutlichen:



**Abbildung 10** Beispiele zur grafischen Darstellung der Regressionsanalyse mit Angabe der zugehörigen Meßwerte

In Abbildung 10a hat man die Kurvenfunktion  $y=2x+0$ . Die Korrelation ist  $r=1$ , das Bestimmtheitsmaß ist  $R^2=1$ . Wären auf der x-Achse die wahren Werte einer Leukozytenpopulation angezeigt, und auf der y-Achse die gemessenen Werte, so sagt diese Gerade folgendes aus: Die Meßmethode auf der x-Achse misst immer doppelt so viel Zellen wie die Meßmethode der y-Achse:  $m=2$ . Dies jedoch geschieht mit einem hohen Bestimmtheitsmaß,

d.h. ohne dabei große Abweichungen der einzelnen Werte von der Regressionsgeraden zu haben:  $R^2=1$ ; 100% der Werte sind durch die Regressionsgerade zu erklären. Die Regression ist positiv und es scheint ein linearer Zusammenhang zu bestehen, die Meßmethoden sind hoch korreliert, sie messen das Gleiche (mit unterschiedlichen Werten).

In Abbildung 10b ist im Unterschied zu Abbildung 10a das Bestimmtheitsmaß mit  $R^2=0,9494$  nicht mehr so gut. Somit sinkt auch die Korrelation auf  $r=0,9744$ . Man kann aber immer noch von einem linearen Zusammenhang sprechen mit einem hohen Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden.

In Abbildung 10c sollte man dagegen Abrücken von der Behauptung, die x und y-Werte unterlägen einem linearen Zusammenhang. Auch wenn man eine Regressionsgerade aufstellen kann mit einer Steigung von  $m=1$ , so ist die Aussagekraft dieser Geraden wegen des niedrigen Bestimmtheitsmaßes von  $R^2=0,0397$  sehr zu bezweifeln: Gerade einmal 3,97% der notierten Werte sind mit dieser Regressionsgeraden zu erklären.

Die Abbildung 10d ist eine häufige Konstellation in den für diese Arbeit durchgeführten Messungen. Die Regressionsgerade hat ein hohes Bestimmtheitsmaß und ist folglich repräsentativ für die erhobenen Daten. Die Steigung ist  $m=0,7$  und der y-Achsenabschnitt  $b=3$ . Man kann an den Werten sehen, dass dadurch im niedrigen Zahlenbereich wie  $x=1$  zu viele Zellen gemessen werden ( $y=3,7$ ), im hohen Bereich wie  $x=20$  aber wiederum zu wenig Zellen gemessen werden ( $y=17$ ). Nur im Bereich um  $x=10$  sind die Zahlen wirklich zuverlässig. Dieser Punkt, hier wird er Kreuzungspunkt KP genannt, lässt sich berechnen, indem man  $x=y$  setzt ( $x=0,7x+3 \Rightarrow x=10; y=10$ ). Im Diagramm ist KP der Punkt, an dem die Regressionsgerade die Winkelhalbierende des Diagramms mit der Formel:  $y=1x+0$  kreuzt.

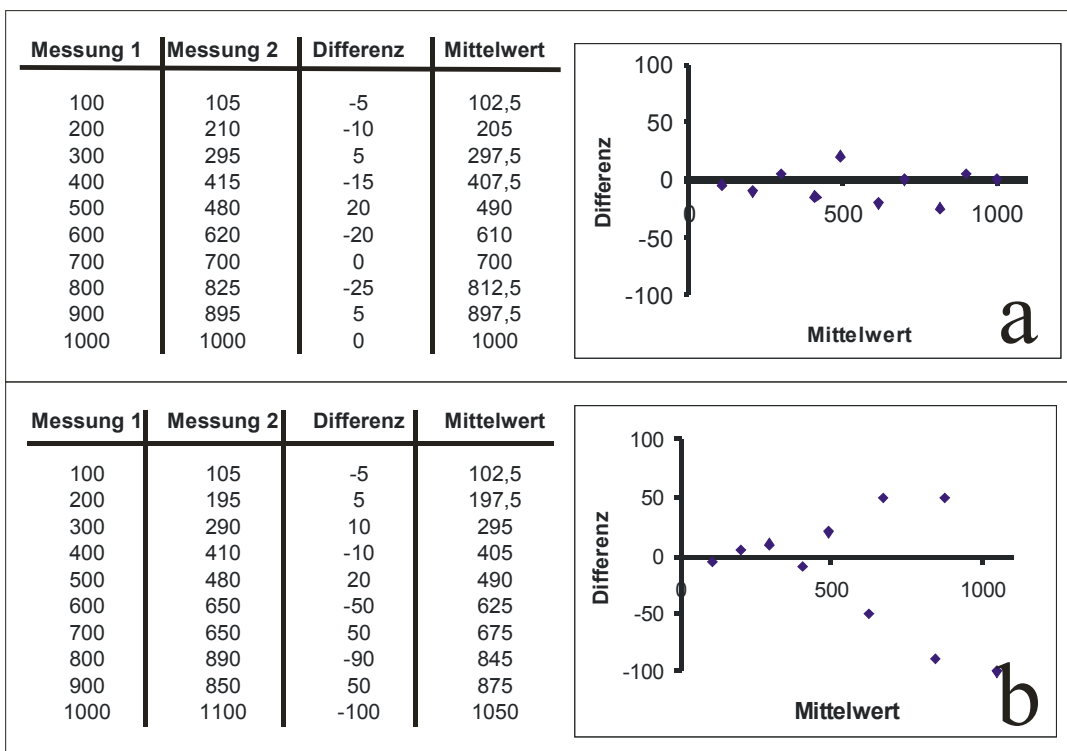
Nun kann mit Hilfe des Mittelwertes und des 95%- oder 5% -Quantils getestet werden, ob der Großteil der Messungen der x-Achse eher kleiner oder größer als der KP ist, folglich die Messungen eher größer oder kleiner ausfallen als die Messungen der y-Achse. In Abbildung 10d ist das 95%-Quantil für die x-Achse = 14,3, der Mittelwert = 8,00. Für die y-Achse gelten 95%-Quantil =14,6, Mittelwert =8,07. Somit liegt der überwiegende Teil der Messergebnisse unterhalb des  $KP=10$ . Somit wissen wir, dass wir tendentiell eher zu große Werte messen, da die meisten Messergebnisse im niedrigen Zahlenbereich angesiedelt sind. Somit ist die Messmethode qualitativ nicht optimal, wegen der Abweichung von den Optimalwerten  $m=1$  und  $b=0$ . Das kann



der Qualität der berechneten Regressionsgeraden mit  $R^2=1$  keinen Abbruch tun. Ebenso wird durch  $r=1$  eindeutig, dass es einen positiven Zusammenhang zwischen den beiden Merkmalen gibt.

### 2.3.4 BLAND-ALTMAN-DIAGRAMM

Ein einfaches, leicht verständliches Werkzeug zum Vergleich zweier Messwerte sind Kurven, in denen man auf der x-Achse den Mittelwert der zwei Messwerte aufträgt, auf der y-Achse die Differenz der zwei Messwerte. Voraussetzung ist, dass beide Messwerte das gleiche aussagen wollen (z.B. eine Leukozytenpopulation im Blut eines Probanden), folglich optimalerweise auf der y-Achse die Differenz der Messwerte 0 ist. Diese Diagramme werden vor allem für den Vergleich neuer Messverfahren als Goldstandart eingesetzt (Bland und Altman, 1986; Bland und Altman, 1999).



**Abbildung 11** Zwei grafisch dargestellte Bland-Altman-Diagramme mit Angabe der zugehörigen Messwerte, Differenzen der Messwerte und Mittelwerten der Messwerte: Vergleich zweier Messungen durch Auftragen der Mittelwerte gegen die Differenz (a) Über die gesamte Messbreite von 100 bis 1000 sind die Abweichungen höchstens 25 Einheiten (b) Man erkennt, dass bei steigenden Messwerten von 100 auf 1000 die Differenz zunimmt, folglich die Messgenauigkeit abnimmt

### 3) ERGEBNISSE

#### 3.1 ERHOBENE DATEN UND KÜRZELERLÄUTERUNG

Es wurden folgende Datensätze ermittelt:

		Leukozyten	CD3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	Kürzel
1. Scan	obere Kammer	√	√	√	√	O1
	untere Kammer	√	√	√	√	U1
2. Scan	obere Kammer	√	√	√	√	O2
	untere Kammer	√	√	√	√	U2
Routinelabor		√	0	0	0	RL

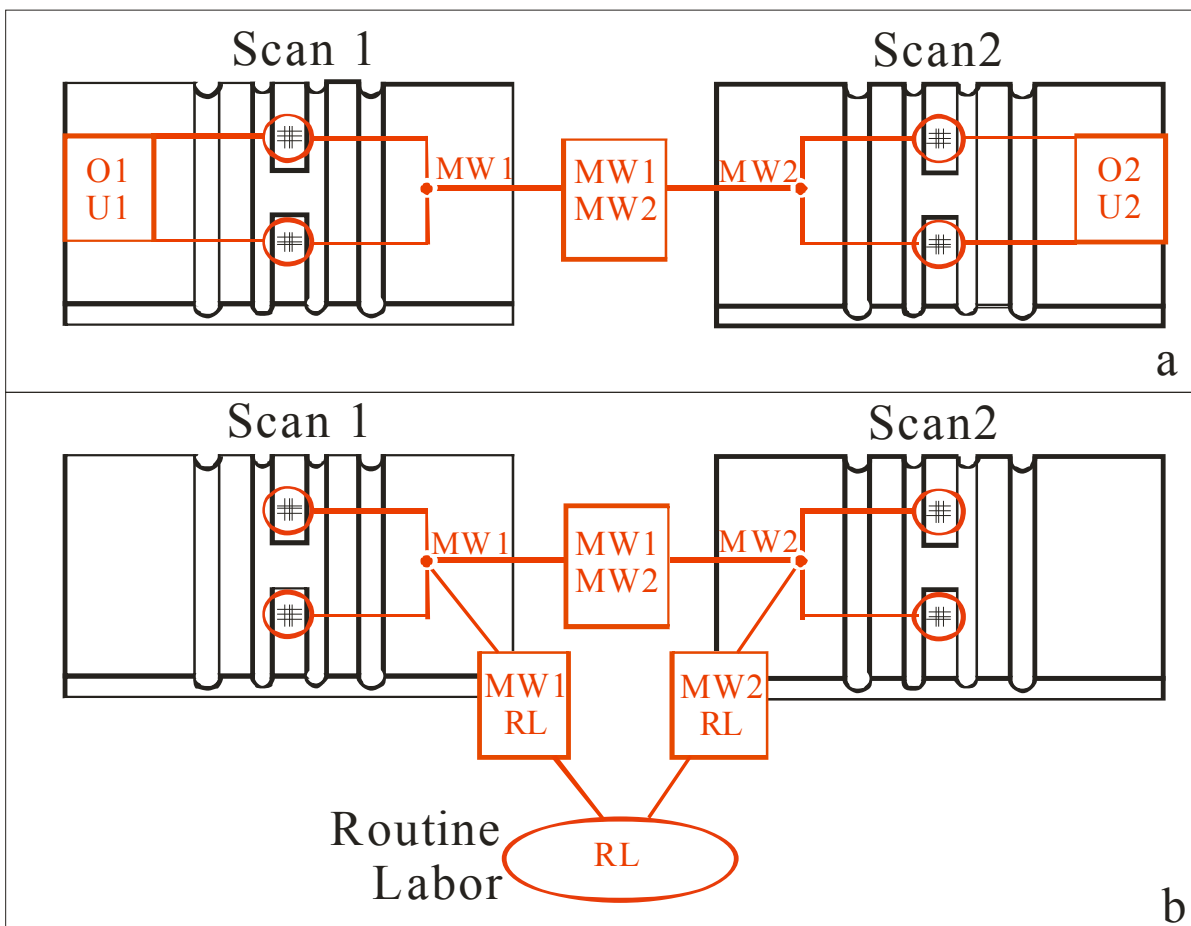
**Tabelle 8 Pro Proband und Messung erhobene Daten mittels LSC und Routinelabor (Sysmex XE-2100) und Angabe des Kürzels, welches im Text verwendet wird;** √ bedeutet Daten erhoben, 0 bedeutet Daten liegen nicht vor

Der Einfachheit halber werden Abkürzungen (s. Abbildung 12) für verschiedene Messdaten eingeführt. Die Zellzahlen aus der oberen Kammer werden mit O abgekürzt, die der unteren Kammer mit U. Die Mittelwerte der oberen und unteren Kammer werden mit MW abgekürzt. Die im Routinelabor mittels Sysmex XE-2100 (Sysmex, Kobe, Japan) erhobenen Werte werden mit RL abgekürzt. Die Zahlen des ersten Scans werden mit einer 1 gekennzeichnet, die des zweiten Scans mit einer 2. O1 meint somit die Zellzahlen der oberen Kammer des ersten Scans, U2 meint die Zellzahlen der unteren Kammer des zweiten Scans. Werden nun beispielsweise die Zellzahlen der oberen Kammer des ersten Scans mit denen der unteren Kammer des ersten Scans verglichen, so wird dies mit O1U1 abgekürzt.

Pro Patient wurden für die Leukozyten-Zahlen jeweils 5 Werte gesammelt, zwei aus dem ersten Scan, zwei aus dem zweiten Scan 15 Minuten später und einmal die Routinelabor-Werte mittels Sysmex XE-2100 (Sysmex, Kobe, Japan). Für die Lymphozyten-Subpopulationen CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> stehen pro Patient 4 Werte zur Verfügung. Diese Subpopulationen werden im

Routinelabor nicht erfasst, folglich kann man diese Zahlen nur einer internen Qualitätskontrolle unterziehen.

Pro Kammer werden  $7\frac{1}{2}$  Minuten Scanzeit benötigt, womit ein Scan, der aus dem Scan der oberen und unteren Kammer besteht, 15 Minuten dauert. Der Wechsel der Neubauer-Zählkammern unter dem LSC, der zwischen dem 1. und dem 2. Scan liegt, ist kurz, ca. 3 Minuten. Ein Scan beginnt jeweils mit der oberen Kammer. Somit unterliegen die Zellen der unteren Kammer des 2. Scans (U2) einer ziemlich genau 30 Minuten längeren Einwirkzeit der Reagenzien als die Zellen der oberen Kammer des 1. Scans (O1), welche zu allererst gescannt werden (siehe auch Kap. 4.1).



**Abbildung 12** Gang der Auswertung zur Analyse der Zuverlässigkeit und Genauigkeit der Messungen - unter Verwendung der Kürzel aus Tabelle 8 - getrennt nach Scan 1 und 2, sowie (a) Intra-Scan-Korrelation: Vergleich der oberen und unteren Kammer eines Scans (O1-U1, O2-U2) und Inter-Scan-Korrelation: Vergleich der Mittelwerte der beiden Scans miteinander (MW1-MW2), als auch (b) Vergleich der Leukozytenzahlen des Routinelabors mit den Mittelwerten der zwei Scans (MW1-RL, MW2-RL)

## 3.2 VERGLEICH DER LEUKOZYTENZAHLEN

	Leukos O1	Leukos U1	Leukos O2	Leukos U2	Leukos- MW1	Leukos- MW2	Leukos RL
<b>Mittelwert</b>	7.147	7.232	7.155	7.399	7.190	7.277	7.396
<b>Median</b>	6.444	6.556	6.444	6.778	6.444	6.789	7.020
<b>Standartabw</b>	2.554	2.540	2.455	2.459	2.465	2.367	2.434
<b>Max</b>	18.022	16.533	19.489	16.644	16.389	18.067	20.370
<b>Min</b>	3.556	3.644	3.289	3.667	3.600	3.722	3.730
<b>75%-Quantil</b>	8.556	8.744	8.367	8.911	8.411	8.850	8.460
<b>25%-Quantil</b>	5.167	5.367	5.456	5.644	5.439	5.617	5.648
<b>Anzahl</b>	119	119	119	119	119	119	118

Tabelle 9 Deskriptive Datenanalyse der Leukozytenzählung, geordnet nach Scan, Kammer und Routinelabor

Die Mittelwerte der Messungen liegen fast 10% über den Medianen, was darauf hindeutet, dass einige Ausreißer nach oben vorkommen. Der Maximal-Wert von 18.022 Zellen/ $\mu$ l in der oberen Kammer des ersten Scans (O1) ist im selben Blut gemessen worden wie die Maximalwerte der anderen Scans, liegt aber weit abgeschlagen von den übrigen Leukozytenwerten. 75% der gemessenen Leukozytenwert sind kleiner (75%-Quantil) als 8.556 Zellen/ $\mu$ l (O1). Nach unten kommen solche Ausreißer nicht vor, da Patienten mit Leukopenie ein seltenes Klientel der HNO-Klinik sind.

Die Anzahl der mit dem LSC durchgeführten Messungen beträgt 119. Aus dem Routinelabor liegen allerdings nur 118 Werte zur Verfügung, da von einem Patienten keine Leukozytenwerte im Routinelabor gemessen wurden. Für den Vergleich von Routinelabor und LSC stehen somit nur 118 Werte zur Verfügung. Die Korrelation der Scans untereinander wurde in 119 Fällen geprüft.

<b><u>Leukozyten</u></b>	<b>O1-U1</b>	<b>O2-U2</b>	<b>MW1-MW2</b>	<b>MW1-RL</b>	<b>MW2-RL</b>
<b>p-Wert*</b>	0,892	0,203	0,092	0,009	0,195
<b>Regressionsgerade</b>	$y=0,87x+1019$	$y=0,86x+1266$	$y=0,90x+823$	$y=0,89x+543$	$y=0,90x+592$
<b>r</b>	0,874	0,856	0,935	0,895	0,929
<b>R<sup>2</sup></b>	0,76	0,73	0,87	0,80	0,86
<b>Bland-Altman-Diagramm</b>	$y=0,01x - 128$	$y=0,00x - 233$	$y=0,04x-392$	$y=-0,11x+543$	$y=-0,10x+592$

**Tabelle 10 Ergebnisse der Statistischen Datenanalyse der Leukozytenzählung, geordnet nach Intra-Scan-Korrelation, Inter-Scan-Korrelation und Vergleich mit dem Routinelabor; \*p-Wert nach Wilcoxon berechnet**

Akzeptiert man eine Fehlerwahrscheinlichkeit 1. Art von  $\alpha=5\%$ , zeigt sich ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Mittelwerte aus dem ersten Scan mit dem Routinelabor: p-Wert (MW1-RL) = 0,009 <  $\alpha=0,05$ . Die Methoden des Routinelabors und des LSC messen scheinbar unterschiedliche Zellzahlen, auch wenn eine Korrelation von  $r=0,895$  durchaus akzeptabel ist. Bei den übrigen Messungen ist ein signifikanter Unterschied nicht erkenntlich (bei  $\alpha=5\%$ ).

Die Korrelationen  $r$  sind allesamt über 0,85. Die Scans in sich korrelieren sehr gut (O1-U1 = 0,874 und O2-U2 = 0,856), man kann dies die **Intra-Scan-Korrelation** nennen. Die Scans untereinander korrelieren noch besser (MW1-MW2 = 0,935), dies kann man die **Inter-Scan-Korrelation** nennen. Beim Vergleich der mit dem LSC erhobenen Werte mit denen des Routinelabors erkennt man, dass die Werte des 2. Scans besser mit dem Routinelabor korrelieren (MW2-RL = 0,929) als die des 1. Scans (MW1-RL = 0,895).

Die Frage, ob man zu bestimmten Zeitpunkten mehr oder weniger Zellen zählt, ist nicht eindeutig zu beantworten, da sich ja in den meisten Fällen auch keine signifikanten Unterschiede erkennen lassen. Man kann aber erkennen, dass der Mittelwert des 2. Scans (MW2) = 7.277 größer ist als der Mittelwert des 1. Scans (MW1) = 7.190. Daraus könnte man folgern, dass im 2. Scan mehr Zellen als im 1. Scan gemessen werden. Der im Routinelabor gemessenen Mittelwert (RL) =

7.396 ist jedoch der größte Wert. Daraus ließe sich schließen, dass vom LSC weniger Zellen als im Routinelabor gemessen werden.

Auch ein Vergleich der Diagramme (Abbildung 17-Abbildung 21) lässt den gleichen Schluss zu. Die Mehrzahl der Messungen (75%-Quantil) liegt in einem Bereich, in dem in der 2. Messung mehr Zellen gezählt werden als in der 1. Messung, d.h. in einem Bereich in dem x kleine Werte annimmt.

In den Bland-Altman-Diagrammen (Abbildung 31-Abbildung 35) erkennt man, dass Ausreißer über das gesamte Meßspektrum vorkommen. Beim Vergleich mit den im Routinelabor erhobenen Daten (Abbildung 34-Abbildung 35) kommt es vor allem im hohen Meßbereich zu Ungenauigkeiten.

### 3.3 VERGLEICH DER LYMPHOZYTENZAHLEN

<b>CD3</b>	<b>O1</b>	<b>U1</b>	<b>O2</b>	<b>U2</b>	<b>MW1</b>	<b>MW2</b>
<b>Mittelwert</b>	1.282	1.320	1.295	1.354	1.301	1.325
<b>Median</b>	1.200	1.267	1.200	1.267	1.267	1.244
<b>Standartabw</b>	596	644	597	640	599	596
<b>Max</b>	3.622	3.800	3.600	4.378	3.711	3.989
<b>Min</b>	178	178	178	156	189	189
<b>75%-Quantil</b>	1.600	1.578	1.644	1.711	1.644	1.667
<b>25%-Quantil</b>	911	856	911	956	944	961
<b>Anzahl</b>	119	119	119	119	119	119

Tabelle 11 Deskriptive Datenanalyse der CD3<sup>+</sup> Zellen, geordnet nach Scan und Kammer

Mittelwerte und Mediane liegen weniger als 10% auseinander. Es wurden Werte von 119 verschiedenen Blutproben erhoben.

<b>CD3</b>	<b>O1-U1</b>	<b>O2-U2</b>	<b>MW1-MW2</b>
<b>p-Wert*</b>	0,123	0,047	0,063
<b>Regressionsgerade</b>	$y=0,93x+122$	$y=0,92x+160$	$y=0,90x+155$
<b>r</b>	0,866	0,860	0,903
<b>R<sup>2</sup></b>	0,75	0,74	0,82
<b>Bland-Altman-Diagramm</b>	$y=-0,08x+69$	$y=-0,08x+41$	$y=0,00x-30$

**Tabelle 12 Ergebnisse der Statistischen Datenanalyse der CD3-Zählung, geordnet nach Intra- und Inter-Scan-Korrelation; p-Wert nach Wilcoxon berechnet**

Die zugehörigen Diagramme sind in Abbildung 22-Abbildung 24 dargestellt. Bei den CD3<sup>+</sup>-Zellen lässt sich ein signifikanter Unterschied in der 2. Messung erkennen: p-Wert(O2-U2) = 0,047 < 0,05. Die übrigen Messungen zeigen keinen signifikanten Unterschied bei  $\alpha = 0,05$ .

Die Korrelation in der 2. Messung ist schlechter als in der 1. Messung. Die beste Korrelation ergibt sich bei der Mittelung der Mittelwerte der beiden Scans. Die Korrelation der einzelnen Scans untereinander (Intra-Scan-Korrelation) kann man als gut bezeichnen ( $r_{O1-U1}=0,866$ ,  $r_{O2-U2}=0,860$ ), die Korrelation der gemittelten Werte der Scans (Inter-Scan-Korrelation) kann man als exzellent bezeichnen ( $r_{MW1-MW2}=0,903$ ).

Es zeigt sich wie bei der Leukozytenzählung, dass sich bei späterem Messen der Leukozyten, somit im 2. Scan, größere Mittelwerte ergeben, allerdings ohne signifikanten Unterschied bei  $\alpha = 0,05$ .

Aus den Bland-Altman-Diagrammen (Abbildung 36-Abbildung 38) wird ersichtlich, dass der Vergleich der Mittelwerte (Abbildung 38) die höchste Zuverlässigkeit aufweist (Bland-Altman-Diagramm (MW1-MW2):  $m = 0$ ).

<b>CD4</b>	<b>O1</b>	<b>U1</b>	<b>O2</b>	<b>U2</b>	<b>MW1</b>	<b>MW2</b>
<b>Mittelwert</b>	784	802	803	826	793	815
<b>Median</b>	689	711	711	733	711	711
<b>Standardabw</b>	409	444	428	430	409	410
<b>Max</b>	2.000	2.289	1.889	2.200	2.000	1.944
<b>Min</b>	67	67	89	89	67	133
<b>75%-Quantil</b>	1.067	1.056	1.144	1.056	1.089	1.083
<b>25%-Quantil</b>	511	522	511	533	533	539
<b>Anzahl</b>	119	119	119	119	119	119

Tabelle 13 Deskriptive Datenanalyse der CD4<sup>+</sup> Zellen, geordnet nach Scan und Kammer

Mittelwerte und Mediane liegen über 10% auseinander. Es wurden Werte von 119 verschiedenen Blutproben erhoben.

<b>CD4</b>	<b>O1-U1</b>	<b>O2-U2</b>	<b>MW1-MW2</b>
<b>p-Wert*</b>	0,388	0,128	0,048
<b>Regressionsgerade</b>	$y=0,91x+89$	$y=0,83x+159$	$y=0,88x+114$
<b>r</b>	0,837	0,826	0,883
<b>R<sup>2</sup></b>	0,70	0,68	0,78
<b>Bland-Altman-Diagramm</b>	$y=-0,09x+53$	$y=-0,01x-17$	$y=-0,00x-20$

Tabelle 14 Ergebnisse der Statistischen Datenanalyse der CD4-Zählung, geordnet nach Intra- und Inter-Scan-Korrelation; p-Wert nach Wilcoxon berechnet

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich der gemittelten Werte der Scans mit p-Wert (MW1-MW2) = 0,048 < 0,05.

Die Korrelation der Scans ist bei der CD4-Leukozyten-Subpopulation nicht so gut wie die Korrelation der anderen erhobenen Zell-Parameter. Dies wird auch aus den Diagrammen (Abbildung 25-Abbildung 27) ersichtlich. Viele Werte liegen weit entfernt von der Regressionsgeraden.

Der Trend, dass bei späterem Messen höhere Zellpopulationen gemessen werden, setzt sich fort.



Aus den Bland-Altman-Diagrammen (Abbildung 39-Abbildung 41) wird ersichtlich, dass es über das gesamte Meßspektrum Ausreißer gibt, es aber keine Präferenz bei hohen oder niedrigen Zellzahlen gibt.

<b>CD8</b>	<b>O1</b>	<b>U1</b>	<b>O2</b>	<b>U2</b>	<b>MW1</b>	<b>MW2</b>
<b>Mittelwert</b>	363	364	371	386	363	378
<b>Median</b>	311	311	333	333	322	344
<b>Standartabw</b>	254	279	255	296	258	267
<b>Max</b>	1.978	1.978	1.711	2.467	1.978	2.089
<b>Min</b>	22	0	22	0	11	11
<b>75%-Quantil</b>	489	467	500	500	456	483
<b>25%-Quantil</b>	222	200	200	222	222	211
<b>Anzahl</b>	119	119	119	119	119	119

**Tabelle 15 Deskriptive Datenanalyse der CD8<sup>+</sup> Zellen, geordnet nach Scan und Kammer**

Median und Mittelwerte differieren um fast 15%. Bei so geringen Zellzahlen ist es allerdings nicht verwunderlich (siehe auch Kap.4.3). Es wurden Werte von 119 verschiedenen Blutproben erhoben.

<b>CD8</b>	<b>O1-U1</b>	<b>O2-U2</b>	<b>MW1-MW2</b>
<b>p-Wert<sup>*</sup></b>	0,799	0,276	0,137
<b>Regressionsgerade</b>	$y=0,96x+15$	$y=1,02x+7$	$y=0,93x+40$
<b>r</b>	0,878	0,880	0,899
<b>R<sup>2</sup></b>	0,77	0,77	0,81
<b>Bland-Altman-Diagramm</b>	$y=-0,10x+35$	$y=-0,16x+45$	$y=-0,04x-2$

**Tabelle 16 Ergebnisse der Statistischen Datenanalyse der CD8-Zählung, geordnet nach Intra- und Inter-Scan-Korrelation; p-Wert nach Wilcoxon berechnet**

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Die Korrelation ist in allen Fällen gut. Bei späterem Scannen besteht eher ein Trend zu höheren Zellzahlen, der aber nicht signifikant ist.

Die Regressionsgeraden (Abbildung 28-Abbildung 30) und die Bland-Altman-Diagramme (Abbildung 42-Abbildung 44) sind leider stark von den Ausreißern nach oben beeinflusst.

## **4) DISKUSSION**

Es wird geprüft, ob es möglich ist, mit diesem Verfahren zuverlässig die absoluten Zellzahlen der Leukozyten und ausgewählter Subpopulationen im Blut zu bestimmen. Dies wird nun von verschiedenen Gesichtspunkten her betrachtet. Es folgt ein Abschnitt über die Erfahrungen, die mit dem noch recht neuen DNA-Farbstoff Draq5<sup>TM</sup> gemacht wurden. Schließlich wird über Perspektiven der Zellzählung mittels LSC diskutiert.

### **4.1 SCHLUSSFOLGERUNGEN AUS DEN ERGEBNISSEN**

Die Bestimmung des kleinen und großen Blutbildes erfolgt routinemäßig mit Hämatologieautomaten. In dieser Arbeit zeigt sich, dass der Vergleich des Hämatologieautomaten Sysmex XE-2100 (Sysmex, Kobe, Japan) mit dem LSC bei den Leukozytenpopulationen eine gute Korrelation aufweist ( $r(\text{MW1-RL})=0,895$ ,  $r(\text{MW2-RL})=0,929$ ), im zweiten Scan zum Zeitpunkt 30 Minuten besser als im ersten Scan. Die Lymphozyten-Subpopulationen, die in dieser Arbeit erfasst wurden (CD3, CD4, CD8) werden im Routinelabor des kleinen oder großen Blutbildes nicht erfasst, sind somit auch nicht vergleichbar. Um diese Lymphozytensubpopulationen zu erfassen, ist die Immunphänotypisierung mittels FCM bisher der Goldstandart. Wie in der Arbeit von Laffers (2004) bereits gezeigt wurde, weist das LSC im Vergleich mit dem FCM eine sehr gute Korrelation bei den Lymphozytensubpopulationen auf.

Berechnet man die Intra-Scan-Korrelation, d.h. vergleicht man die Zellzahlen, die in der oberen und in der unteren Kammer gemessen werden, so zeigen sich im ersten und im zweiten Scan gleiche Ergebnisse. Sowohl die Zellzahlen im ersten Scan korrelieren gut untereinander ( $r_{\text{CD3}}(\text{O1-U1})=0,866$ ,  $r_{\text{CD4}}(\text{O1-U1})=0,837$ ,  $r_{\text{CD8}}(\text{O1-U1})=0,878$ ,  $r_{\text{Leukos}}(\text{O1-U1})=0,874$ ), als auch die Zellzahlen des zweiten Scans ( $r_{\text{CD3}}(\text{O2-U2})=0,860$ ,  $r_{\text{CD4}}(\text{O2-U2})=0,826$ ,  $r_{\text{CD8}}(\text{O2-U2})=0,880$ ,  $r_{\text{Leukos}}(\text{O2-U2})=0,856$ ). Diese Zellen wurden etwa in einem Abstand von 7½ Minuten nacheinander gescannt, so lange dauert es, bis das LSC eine Kammer vollständig ausgezählt hat.

Berechnet man die Inter-Scan-Korrelation, d.h. berechnet man die Mittelwerte der Zellzahlen aus oberer und unterer Kammer eines Scans, und vergleicht diese Werte mit den Mittelwerten des anderen Scans, so zeigen sich für die CD3-Zell-Zählung und die Leukozytenzählung eine exzellente Korrelation der Scans untereinander ( $r_{\text{Leukos}}(\text{MW1-MW2})=0,935$ ,  $r_{\text{CD3}}(\text{MW1-MW2})=0,903$ ). Die CD4- und CD8-Zellen zeigen eine gute Korrelation ( $r_{\text{CD4}}(\text{MW1-}$

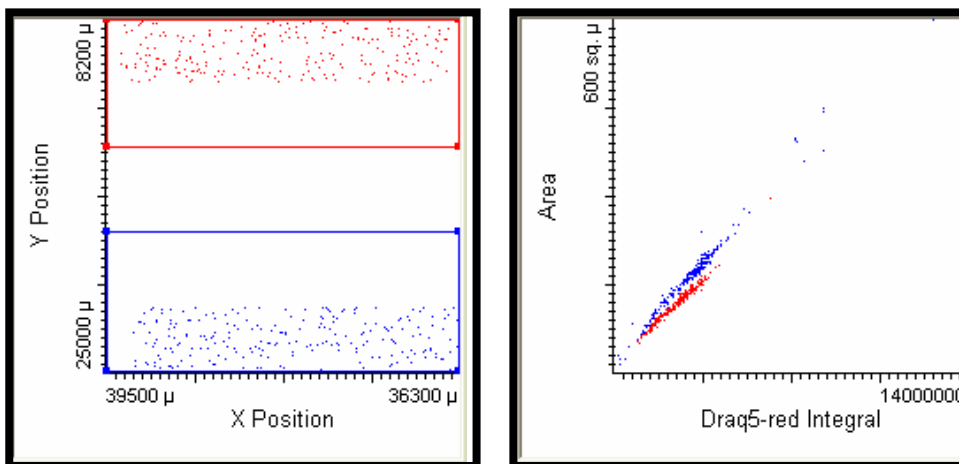
MW2)=0,883,  $r_{CD8}(MW1-MW2)=0,899$ ). Die Zellen werden im Abstand von 15-20 Minuten gescannt. Im zweiten Scan werden andere Zellen als im ersten Scan gezählt, da ein Aliquot des Ansatzes erneut auf eine weitere Neubauer-Zählkammer gebracht wurde, welches bis dahin im Kühlschrank verweilte. Es werden nicht die Zellen des ersten Scans in der Neubauer-Zählkammer erneut ausgezählt. Die Zellen für den zweiten Scans werden 15-20 Minuten im Kühlschrank als Suspension gelagert und konnten weiteren Fluoreszenzfarbstoff aufnehmen (dieser Effekt wurde durch die Temperatur im Kühlschrank von 4°C minimiert). Auf den Effekt dieser unterschiedlichen Inkubationszeit wird später eingegangen werden (s. Kap 4.3).

Bei optimaler Übereinstimmung der Methoden LSC und Routinelabor, bzw. bei optimaler Übereinstimmung des ersten und zweiten Scans, wäre die Korrelation  $r=1$ . Dieser Wert wird nicht erreicht (minimal:  $r_{CD4}(O2-U2)=0,826$ ; maximal:  $r_{Leukos}(MW1-MW2)=0,935$ ). Im folgenden Abschnitt werden Ursachen der nicht optimalen Korrelation von  $r=1$  dargelegt:

Die mit Fluorochromen konjugierten monoklonalen Antikörper unterliegen zwei gegensätzlichen Faktoren, die die Zellen unter dem LSC leuchten lassen. Zum einen gibt es den Bleaching-Effekt. Die Fluorochrome bleichen aus, einige schneller als andere, wie dies eindrucksvoll in der Arbeit von Laffers (2004) für CD3-FITC, CD14-PE und CD45-APC (Caltag, Burlingame, CA, USA) gezeigt wurde. Um den **Bleaching-Effekt** zu vermeiden, wurden die Proben in abgedunkelten Räumen verarbeitet. Offensichtlich konnte so dieser Effekt weitgehend vermieden werden, da im zweiten Scan die Zellzahl eher zunimmt, was aus den Diagramm hervorgeht: Der Kreuzungspunkt KP (siehe Kap. 2.3.4) liegt in vielen Fällen weit überhalb des 50%-Quantils. Aber auch durch den einfachen Vergleich der Mittelwerte lässt sich dies erkennen (CD3-Mittelwert<sub>MW1</sub>=1301 Zellen/ $\mu$ l, CD3-Mittelwert<sub>MW2</sub>=1325 Zellen/ $\mu$ l; CD4-Mittelwert<sub>MW1</sub>=793 Zellen/ $\mu$ l, CD4-Mittelwert<sub>MW2</sub>=815 Zellen/ $\mu$ l; CD8-Mittelwert<sub>MW1</sub>=363 Zellen/ $\mu$ l, CD8-Mittelwert<sub>MW2</sub>=378 Zellen/ $\mu$ l). Diese Unterschiede in den Messungen sind allerdings nicht signifikant ( $p>0,05$ ) mit Ausnahme bei der CD4 Zählung ( $p_{CD4}(MW1-MW2)=0,048<0,05$ ). Diese zunehmende Zellzahl kann dadurch erklärt werden, dass die monoklonalen Antikörper, die mit Fluorochromen konjugiert sind, sich mit der Zeit vermehrt an der Zelloberfläche anheften können und somit mehr Zellen im Laserlicht intensiv fluoreszieren. Dieser Effekt ist, je nach Fluorochrom und Antikörper, unterschiedlich ausgeprägt, was unter anderem die unterschiedlichen Korrelationswerte zwischen Draq5™, CD3, CD4 und CD8 erklärt. Außerdem kann der Farbstoff Draq5™ besser in die Zellen diffundieren, und so mehr Zellkerne anfärben.

Insgesamt kann man sagen, dass die **Zellen mit der Zeit mehr Farbstoff annehmen**. Im Kühlschrank scheint dieser Effekt jedoch nicht so stark ausgeprägt zu sein, da die Zellzahlen in den sieben Minuten während eines Scans stärker ansteigen (z.B. von  $\text{CD3-Mittelwert}_{O1}=1.282$  Zellen/ $\mu\text{l}$  auf  $\text{CD3-Mittelwert}_{U1}=1.320$  Zellen/ $\mu\text{l}$  um 38 Zellen/ $\mu\text{l}$ ) als in den 15 Minuten, die zwischen den Scans liegen (z.B. von  $\text{CD3-Mittelwert}_{O1}=1.282$  Zellen/ $\mu\text{l}$  auf  $\text{CD3-Mittelwert}_{O2}=1.295$  Zellen/ $\mu\text{l}$  um 13 Zellen/ $\mu\text{l}$ ). Dieser Effekt des „mehr Farbstoff Annehmens“ zeigt sich unter anderem darin, dass im Diagramm Draq-5-Integral vs. Area die Zellen des Scans der unteren Kammer immer oberhalb und eher rechts von den Zellen der oberen Kammer liegen (Abbildung 7, Abbildung 13). Somit scheinen diese Zellen intensiver zu fluoreszieren, weil sie möglicherweise mehr Farbstoff in die Zellen aufgenommen haben. Es ist anzunehmen, dass durch diesen Effekt auch mehr Zellen vom LSC erkannt werden.

Ein weiterer Grund für den scheinbaren Anstieg der Zellzahlen in der unteren Kammer ist sicherlich durch **Sedimentation** zu erklären. Die Zellen der unteren Kammer lagern sich mit der Zeit auf den Boden der Kammer ab, und sedimentieren so in den Fokus der Mikroskoplinse. Dadurch sind in der unteren Kammer mehr Zellen als in der oberen Kammer scharf erkennbar, was wiederum zu einer erhöhten Zellzahl führen kann.



**Abbildung 13** Vom LSC analysierte Zellen, mit der WinCyte Software Version 3.7 separiert in obere (rote Zellen) und untere Kammer (blaue Zellen). Aufgetragen in ein Diagramm Area vs. Draq5-red Integral, welches zur Einzelzellseparierung genutzt wurde (Abbildung 7). Zellen der unteren Kammer (blau), welche später gescannt werden, stellen sich größer (weiter oben auf der Area-Achse) und heller (weiter rechts auf der Draq5-red Integral-Achse) dar, als die Zellen der oberen Kammer (rot)

Der Hauptgrund für die unterschiedlichen Regressionen und Mittelwerte der CD3,CD4 und CD8-Zählung wird allerdings die Zufallsvariabilität sein. Die wenigen Fälle von signifikanten Unterschieden in den Messungen (CD3 (O2-U2), CD4 (MW1-MW2)) sind als Ausnahme von der Regel anzusehen. Man kann hier keine methodischen Unterschiede nachweisen. Lediglich der signifikante Unterschied in der Leukozytenzählung im ersten Scan und in der Routinelaborzählung (Leukos(MW1-RL)) könnte auf eine Bevorzugung des zweiten Scans als Routineanwendung schließen lassen.

## 4.2 SOFTWARESPEZIFISCHE PROBLEME

Beim Umgang mit dem LSC sind einige Software-spezifische Probleme aufgetreten. Mit der Win-Cyte Version 3.7 zur Verwertung der vom LSC erhobenen Daten war es nicht möglich, diese Probleme zu lösen. Einige Zellen die offensichtlich im Scanbereich liegen, werden nicht als Zelle erkannt, und werden somit auch nicht ausgewertet, da die Informationen der Pixel, die nicht innerhalb einer Analysekontur liegen, verloren gehen (Gerstner et al., 2007).

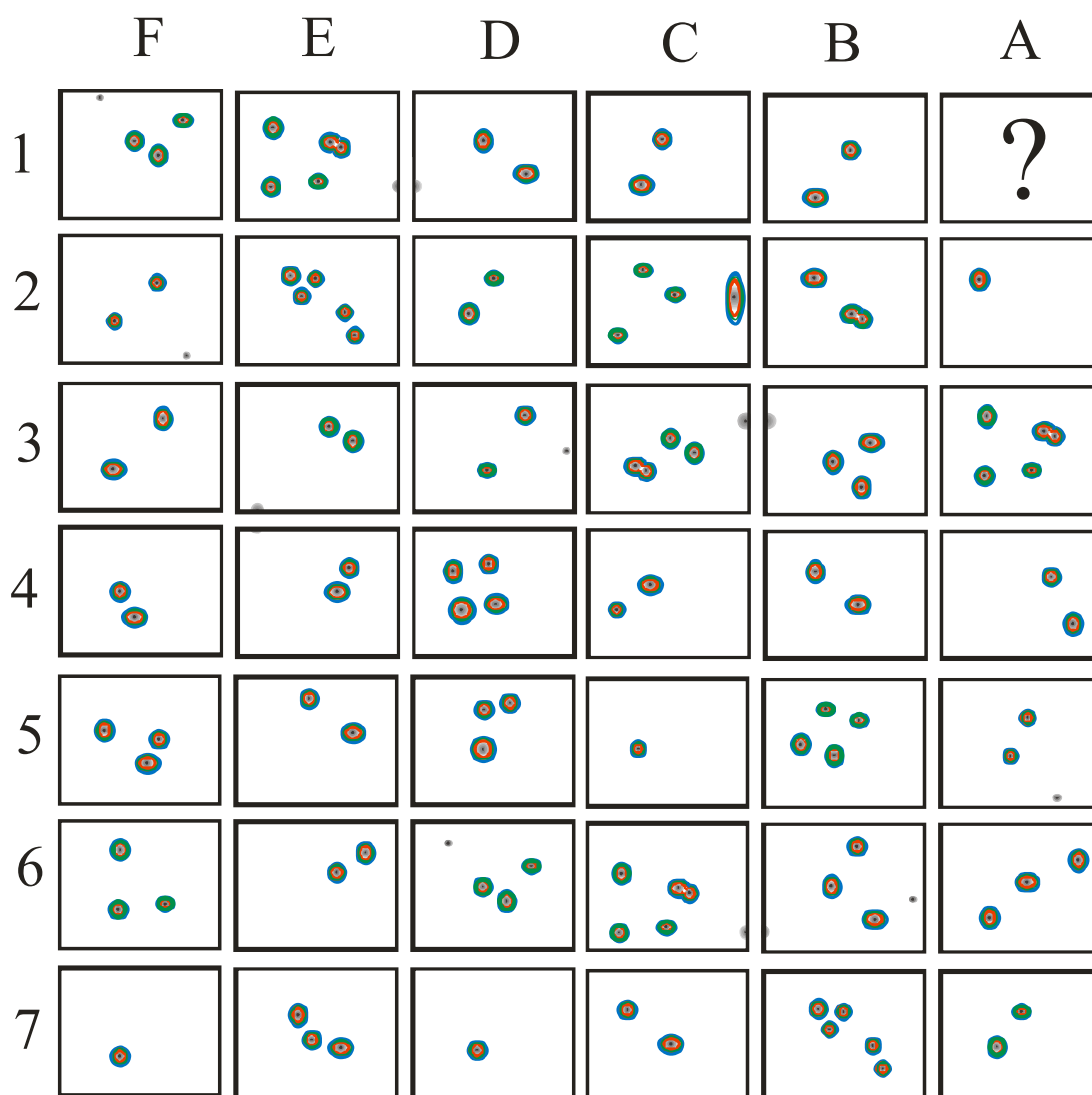
Eine Kammer der Neubauer-Zählkammer besteht aus einer Fläche von 3x3mm. Das LSC analysiert diese Fläche, indem es 6x7 einzelne Scan-Bilder anfertigt (Abbildung 14). Die Win-Cyte Software Version 3.7 hat beim Auswerten der erhobenen Daten folgende drei Probleme:

1) **Problem der Doubletten:** Manchmal kommt es vor, dass zwei Zellen zu nahe beieinander liegen, um von der Win-Cyte-Software als zwei einzelne Zellen erkannt zu werden, und sie somit als eine Zelle verarbeitet werden. Dieser Effekt ist in Abbildung 15 dargestellt. Es ist möglich, diese Zellen mit der Software so auszusortieren, dass man sie nicht mitzählt. In Abbildung 7a kann man im Diagramm Draq5-Area vs. Draq5-Integral erkennen, dass rechts oberhalb des mit rot markierten Bereiches ein zweiter Bereich markiert ist (Region 2). Dort sind die Doppelten Zellen zu finden. Man kann auch diese Zellen zählen und mit dem Faktor zwei multipliziert in die endgültige Zellzahl mit einbeziehen. Allerdings kann man diese Zellen nicht auf ihre CD-Eigenschaften untersuchen, da es selten vorkommt, dass beide Zellen die gleiche CD-Eigenschaften haben. Außerdem kommt es manchmal vor, dass ein Staubkorn eingescannt wird. Staubkörner haben etwa die Größe einer Doublette und „leuchten in allen Farben“. Sie sind positiv für Draq5, CD3, CD4 und CD8. Diese Staubkörner würden das Endergebnis nur verfälschen. Darum wurden diese Doubletten in der Zählung der Leukozyten und der Lymphozyten-Subpopulationen nicht mit einbezogen. Es handelt sich auch nicht um eine sehr große Anzahl an Zellen (<6% der einzelnen Zellen).

2) **Problem des ersten Scan-Bildes:** Achtet man am Anfang des Scan-Vorganges auf die Zellzahlen, so bemerkt man, dass die Zellen des ersten Scan-Bildes nicht gezählt werden. Kopiert man während des Scan-Vorganges jedes einzelne Scan-Bild, und rekonstruiert dann mit Hilfe eines Computer-Zeichenprogramms die Scan-Area, so kommt man ebenfalls zu dem Ergebnis, dass das erste Scan-Bild nicht in der Zählung erfasst wird. Wie in Abbildung 14 schematisch dargestellt, wird das Scan-Bild 1A nicht erfasst, obwohl es zur Scan-Area gehört. Diese

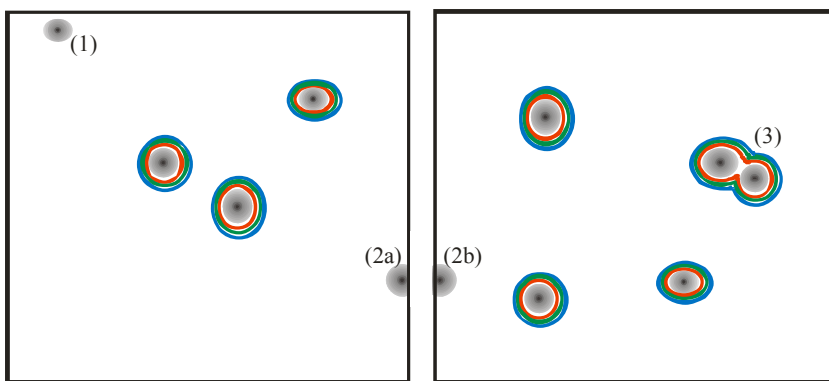
Besonderheit gilt allerdings nur für die obere Kammer. In der unteren Kammer ist dieses Problem nicht mehr festzustellen. Die untere Kammer wird ohne Unterbrechung nach der oberen Kammer gescannt.

Somit muss man sagen, dass bei  $6 \times 7 = 42$  Scan-Bildern ein Scan-Bild bei der oberen Kammer fehlt. In der oberen Kammer fehlen somit  $1/42$  oder 2,4% der Zellen.



**Abbildung 14 Schematische Rekonstruktion der Scan-Area der oberen Kammer aus den einzelnen Scan-Bildern zur Verdeutlichung der Software-Sezifischen Probleme:** Erkannte und zu analysierende Zellen werden von der WinCyte Software Version 3.7 kontouriert. Problem der Rand-Zellen: Zellen am Scan-Bild-Rand sind sichtbar, werden aber nicht von der Software erkannt (keine Konturierung). Problem des ersten Scan-Bildes: Das erste Scan-Bild (A1) wird nicht verarbeitet.

3) **Problem der Rand-Zellen:** Wenn Zellen sehr nahe am Rand eines Scan-Bildes sind, werden sie von der Win-Cyte-Software nicht mehr als Zelle erkannt. Das hat den Sinn, dass Zellen, die nur halb auf dem einen Scan-Bild und halb auf dem anderen Scan-Bild (Abbildung 15) sind, nicht doppelt gezählt werden. Allerdings werden auch Zellen, die randständig vollständig auf einem Scan-Bild sind, nicht mehr als Zelle erkannt. Bei der Rekonstruktion der einzelnen Scan-Bilder zu einem großen Scan-Bild (zur Scan-Area) kann man diese randständigen Zellen zählen. Man kommt regelmäßig auf etwa 10% der Zellen, die somit nicht in der endgültigen Zellzählung erfasst werden.



**Abbildung 15** Zwei schematische Scan-Bilder nebeneinander gelegt; Vergrößerung aus Abbildung 14 mit kontourierten und nicht kontourierten Zellen (1) einmal vollständig unerkannte Rand-Zelle, (2) zweimal nicht erkannte Rand-Zelle im linken (2a) und rechten (2b) Scan-Bild; (3) eine Doublette wird als einzelne Zelle erkannt

Bei der Lösung der Probleme des ersten Scan-Bild und der Rand-Zellen könnte man versucht sein, auf die endgültige Zellzahl eines Scans (z.B. 4200 Zellen/ $\mu\text{l}$ ) 10% mehr Zellen zu addieren, zum Ausgleich für die fehlenden Rand-Zellen (+420 Zellen/ $\mu\text{l}$ ), und ebenso 2,4% Zellen in der oberen Kammer (+100 Zellen/ $\mu\text{l}$ ), für die fehlenden Zellen des ersten Scan-Bildes. Somit käme man bei einer Zellzahl von 4200 Zellen/ $\mu\text{l}$  letztlich auf eine Gesamtzahl von  $4200 + 420 + 100 = 4720$  Zellen/ $\mu\text{l}$ . Der Mittelwert des Routinelabors für die einzelnen Kammern liegt auch durchweg um ca. 10% über den Mittelwerten der oberen und unteren Kammern der beiden Scans. Der Faktor Zelle/ $\mu\text{l}$  Routinelabor zu Zelle/ $\mu\text{l}$  LSC liegt im ersten Scan bei 0,89 und beim zweiten Scan bei 0,90, wie aus Tabelle 10, bzw. aus Abbildung 20 und Abbildung 21 zu entnehmen ist.

Jedoch ändert sich dabei nicht die Korrelation der Werte, wie in Abbildung 10 und in Kap. 2.3.3 gezeigt. Durch Multiplikation einer Gruppe von Werten, die miteinander korreliert werden sollen, ändert sich die Signifikanz, nicht jedoch die Korrelation. Praktisch formuliert heißt das, ob wir



mit unserer Meßmethode doppelt so viele Zellen, zehn mal so viele Zellen oder 1,1-mal so viele Zellen zählen wie das Routinelabor, die Korrelation bleibt immer die gleiche. Es würden sich zwar signifikante Unterschiede zeigen, da es schon einen Unterschied macht, ob bei einer vorhandenen Zelle eine, zwei, zehn oder 1,1 Zellen gezählt werden. Aber die Korrelation bleibt gleich. Die Multiplikation mit einem festen Faktor wurde deswegen auch nicht durchgeführt. Würde man diese Methode als Routineverfahren benutzen, wäre es allerdings nötig, neue Ober- und Untergrenzen der Zellzahlen festzulegen. Es ist nicht möglich, die Referenzwerte der bisherigen Methoden zu übernehmen.

Die gerätespezifischen Probleme können somit ignoriert werden. Entweder sie würden unnötig großen Aufwand für wenig Zählgenauigkeit liefern, wie im Falle der Doubletten, oder sie würden keine Verbesserung der Genauigkeit, sprich Korrelation ergeben, wie im Falle des ersten Scan-Bildes und der Rand-Zellen.

#### 4.3 VOR- UND NACHTEILE DES LSC

Das LSC bietet enorme Möglichkeiten und wird in der Forschung immer mehr angewendet (Gerstner und Tarnok, 2002). Vor allem die slide-based Cytometry bietet hierbei enorme Vorteile (Gerstner et al., 2004). Die Arbeit mit dem LSC bietet im Vergleich zur Arbeit mit anderen Zellzahl-Bestimmungs-Methoden folgende Vorteile:

- Eine absolute Zellzählung mit dem LSC ist möglich. Zur Zeit bilden Hämatologie-Automaten mit dem Prinzip der Impedanzmessung und Durchflusszytometrie hier den Goldstandard. Diese Untersuchung zeigt, dass sich diese Methode der absoluten Zellzählung aus der Kombination LSC und Neubauer-Zählkammer **mit dem Goldstandard messen lassen** kann. Dass sich die Methode auch mit der FSC messen kann, wurde bereits in anderen Arbeiten sowohl für periphere Blutzellen (Laffers, 2002), als auch für festes Gewebe (Bocsi et al., 2004) gezeigt.
- Der **Reagenzienverbrauch** ist bei dieser Methode **minimal**. Beim Einsatz des LSCs sind im Allgemeinen Einsparungen von Antikörpern und somit der Verbrauchskosten zu beobachten (Clatch et al., 1996). Laffers (2004) beschreibt, dass durch die komplexe Präparation für das FCM, mit teils mehreren Zentrifugationen, ein signifikanter Zellverlust auftreten kann, und deswegen zur Kompensation große Zellzahlen analysiert

werden. Pro Ansatz in dieser Arbeit mit dem LSC werden dreimal jeweils 0,5µl Fluoreszenz-Antikörper-Konjugat verbraucht und 1µl Draq5™. Draq5™ kann sogar noch verdünnt werden, allerdings wurde es in dieser Arbeit in purem Zustand verwendet. Ebenso kann man monoklonale Antikörper ohne Einbuße an Sensitivität wenigstens 1:2 oder 1:5 verdünnen (Kabelitz und Wesch, 2007). Laut offiziellem Vertriebspartner der Firma Caltag kosten 0,5ml Human-CD3-R-RE-Konjugat 259,00€, 0,5ml Human-CD4-Alexa 488-Konjugat und Human-CD8-Tricolor-Konjugat kosten 323,00€ (<https://catalog.invitrogen.com> vom 04.10.2006). 200µl Draq5™ kosten laut Hersteller Biostatus 195,00£ (<http://biostatus.com/product/draq5> vom 04.10.2006). Somit liegt der Verbrauch an Fluoreszenzfarbstoffen pro Blutanalyse zur Zeit bei ca. 10,50€, und könnte durch Verdünnen unter 10,00€/Blutanalyse gehalten werden. Eine herkömmliche Zellzählung der CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten wird pro Test mit rund 100€ angegeben (Eberle, 2006). Von der Gebührenordnung für Ärzte (GOÄ, Stand 1.12.2004) können für die ersten 3 Reagenzien bei der Phänotypisierung von Zellen je Antiserum 33,22€ abgerechnet werden (GOÄ Nr. 3696, Faktor 1,0), jedes weitere Antiserum lässt sich mit 14,57 € abrechnen (GOÄ Nr. 3697, Faktor 1,0).

Obwohl bei dieser Methode die gleichen Reagenzien benutzt werden wie bei der Flow Cytometry, können die Reagenzien-Mengen im Verhältnis zur Flow Cytometry niedrig gehalten werden, da minimale Blutmengen analysiert werden (10µl Vollblut/Patient). Von der Firma Partec, Münster, sind Geräte zur CD4<sup>+</sup>-Lymphozytenzählung auf dem Markt, z.B. das CyFlow® SL, das einen Preis von 1,75€/Test zur absoluten Zellzählung und 2,50€/Test zur relativen Zellzählung verspricht. Das CyFlow® SL zeigt in der klinischen Anwendung eine hohe Korrelation zu herkömmlichen Methoden der CD4<sup>+</sup>-Lymphozytenzählung zwischen  $r=0,942$  und  $r=0,989$  (Cassens et al., 2004; *siehe auch* Mansa et al., 2007; Lyen et al., 2006; Zijenah et al., 2006; Dieye et al., 2005). In der Produktbroschüre werden sogar Korrelationen von  $r=0,9979$  beschrieben (<http://www.partec.de/products/CyFlowSL.pdf>).

- Objektträger-basierte Verfahren sind besonders von Vorteil, wenn nur minimale Probenmengen zur Verfügung stehen (Gerstner et al., 2007). Die in dieser Arbeit benutzen **kleinen Blutmengen** von 10µl Vollblut/Patient würden es sogar erlauben, die Leukozytenzählung aus Kapillarblut zu ermöglichen. In einigen Versuchen für diese

Arbeit wurde dies sogar erfolgreich getestet. Da die Vergleichszellzahlen des Zentrallabors jedoch aus einem EDTA-Blutröhrchen entnommen wurden, wurde auch bei dieser Arbeit versucht, die Versuchsbedingungen identisch zu halten. Daher wurde ebenfalls EDTA-Vollblut benutzt. Kapillarblut hätte außerdem den Nachteil, dass es nicht so lange gelagert werden kann bis zur Weiterverarbeitung.

- Ein weiterer Vorteil, der mit den geringen benötigten Probemengen zusammenhängt, ist in der Analyse von gering vorhandenen Flüssigkeiten zu sehen. Bei der Analyse von Liquor, Sputum und Punktaten von z.B. Aszites oder Pleuraerguss ist wegen der geringen Probemenge das LSC dem FCM klar überlegen. Clatch et al. berichteten 1996 über den Einsatz des LSCs zur Analyse von Lymphknotenbiopsaten, Knochenmarks-Aspiraten, Blut, Feinnadel-Biopsaten und anderen Körperflüssigkeiten. Ein Jahr später (1997) berichteten Clatch und Walloch über eine größer angelegte Studie von Feinnadel-Biopsaten und anderen zellarmen Proben mit dem LSC. 1998 berichtete dann Clatch et al. über den praktischen Einsatz des LSCs bei der Leukämie- und Lymphomdiagnostik. Die FCM ist zwar eine Methode, mit der man viele Analysen schnell durchführen kann (Kuckuk et al., 2001), hat aber den Nachteil, dass große Zellzahlen benötigt werden (Bocsi et al., 2004). Das stellt bei der Analyse von zellarmen und mengenmäßig geringen Flüssigkeiten ein Problem der FCM dar, wie z.B. Liquor. Hier ist die SBC eine Alternative, wie auch Bocsi et al. 2004 darlegten. Dass das LSC eine „state-of-the-art“-Alternative zur FCM ist, wurde schon mehrfach gezeigt (Tárnok und Gerstner, 2002; Kamensky et al., 1997; Clatch et al., 1996).
- Es wurde ein **lyse-no-wash** Ansatz unter der Verwendung eines „**single-platform**“-Ansatzes angewendet. „Single-platform“-Ansätze haben sich in vielen Studien den „Dual platform“-Ansätzen als überlegen erwiesen (Gruber, 2007). Der lyse-no-wash Ansatz ist eine einfach durchführbare Methode der Immunphänotypisierung. Es wird nicht zentrifugiert, was zu einem selektivem Verlust von CD8<sup>+</sup> Zellen führen würde, und so die CD4<sup>+</sup> Lymphozyten anreichern würde (Gruber, 2007). Theoretisch ist sogar ein no-lyse-no-wash Ansatz denkbar, da die Lyse der Erythrozyten zur Auszählung der Kammern nicht erforderlich ist. Aus laborinternen Studiengründen wurde dem Lyse-no-wash-Ansatz der Vorrang gegeben, da man so noch eine lichtmikroskopische manuelle Zellzählung durchführen konnte.

- Wie schon häufig als großer Vorteil der slide-based Cytometry beschrieben (Laffers, 2004; Gerstner et al., 2004; Gerstner et al., 2007), wäre es denkbar, die in die Neubauer-Zählkammer eingebrachten Zellen wiederholt zu scannen. In der FCM gehen die einmal analysierten Zellen verloren, da sie mit dem Flüssigkeitsstrom in den Abfallbehälter geleitet werden. Nur durch einen technisch aufwendigen und Zeit fordernden Prozess ist eine Zellsortierung zur wiederholten Analyse möglich, welcher zur Routineanwendung nicht brauchbar ist (Laffers, 2004). Es wurde von Chapman (2000) beobachtet, dass es durch den dabei entstehendem Druck zu mechanischen Irritation der Zellen kommt. In dieser Arbeit war es nicht nötig, wiederholt zu scannen, da alle Fluorochrome mit den vorhandenen Filtern und den vier PMTs erkannt werden konnten. Es wäre allerdings denkbar, so durch wiederholtes Scannen und Austauschen der Filter zwischen den Scans mit nur einem PMT eine vollständige Fluorochromanalyse durchzuführen.
- Die Methode ist äußerst **zuverlässig** in der Erhebung von Daten. Neben den 119 Fällen, die für diese Arbeit ausgewertet wurden, wurden lediglich 12 weitere Fälle nicht ausgewertet. Alle diese Fälle wurden aus methodischen Gründen nicht ausgewertet, wie in Tabelle 17 dargestellt. Alle diese Fehler wurden sofort nach dem Scan bemerkt.

<b>Ursache</b>	<b>Fallzahl</b>
• vertauschte Antikörper-Fluorochrom-Konjugate	3
• falsche Lagerung zwischen dem ersten und zweiten Scan	2
• fehlende Vergleichsdaten aus dem Routinelabor	4
• fehlende Messdaten nach einem Scan (Hardwaredefekt?)	2
• keine Hämolyse nach 15 Minuten	1

**Tabelle 17 Methodische Fehlerquellen bei der Lymphozytensubtypisierung im peripheren Blut**

Nachteile der Methode:

- Ein **LSC** ist **in Routinelaboren** häufig nicht vorhanden. Die Analyse von flüssigen Medien mittels LSC ist die Ausnahme. In den meisten Publikationen werden feste Gewebe untersucht. Daher wird dieses Gerät hauptsächlich in der Erforschung vor allem der lymphatischen Organe des Immunsystems eingesetzt, und hat in Routinelaboren zur Blutanalyse bisher wenig Verwendung gefunden.
- Die **Analyse einer kleinen Blutmenge** hat folgenden Nachteil. In der Neubauer-Zählkammer wird pro Kammer ein Volumen von  $3 \times 3 \times 0,1 \text{ mm}^3 = 0,9 \mu\text{l}$  analysiert. Zudem liegt eine Blutverdünnung von 1:20 vor. **Eine gezählte Zelle** in der Neubauer-Zählkammer repräsentiert somit in der endgültigen Zählung **22,22 Zellen/ $\mu\text{l}$** , da  $20/0,9 = 22,22$  ist. Zählen wir 10 Zellen mit dem LSC, so wird als Zellzahl 222 Zellen/ $\mu\text{l}$  angegeben. Zählen wir 11 Zellen, so entspricht dies 244 Zellen/ $\mu\text{l}$  usw.. Die CD8 Mediane und Mittelwerte differieren wegen der geringen Zellzahl um fast 15%. 363 Zellen/ $\mu\text{l}$  (CD8-Mittelwert, O1) entspricht einer vom LSC gezählten Zellzahl von 16,3 Zellen ( $363/22,22=16,3$ ). 311 Zellen/ $\mu\text{l}$  (CD8-Median, O1) entspricht einer vom LSC gezählten Zellzahl von 14,0 Zellen ( $311/22,22=14,0$ ). Mittelwert und Median unterscheiden sich folglich um ca. 2 gezählten Zellen im LSC, umgerechnet 44,44 Zellen/ $\mu\text{l}$ , was bei einem Mittelwert von 363 Zellen/ $\mu\text{l}$  ca. 12% der Zellen sind ( $44,44/363=12\%$ ). Das bedeutet, dass vor allem bei kleinen Zellzahlen relativ große Unterschiede in der Zellzahl/ $\mu\text{l}$  zu erwarten sind.

Bei größeren Zellzahlen, wie sie bei den Leukozyten vorkommen, ist ein Unterschied von 2 gezählten Zellen auf 320 gezählten Zellen relativ wenig. 320 gezählte Zellen entsprechen 7110 Zellen/ $\mu\text{l}$ , 322 gezählte Zellen entsprechen 7155 Zellen/ $\mu\text{l}$ . 44,44 Zellen/ $\mu\text{l}$  Unterschied ergeben hier eine Differenz von unter 1%.

- Gruber (2007) fordert, um einen **akzeptablen Variationskoeffizienten (<10%)** zu erreichen, mindestens 100 positive Ereignisse auszuwerten. Einzig bei den Leukozyten ist bei dieser Methode der Wert überschritten. Bei den CD3<sup>+</sup> Lymphozyten werden in wenigen Ausnahmefälle wenig mehr als 100 Zellen in einer Kammer gezählt. Das 25%- und 75%-Quantil der CD3<sup>+</sup> liegt bei 42-73 Zellen/Kammer (MW1). Das 25%- und 75%-Quantil der CD4<sup>+</sup> liegt bei 24-49 Zellen/Kammer (MW1). Das 25%- und 75%-Quantil der

CD8<sup>+</sup> liegt bei 11-21 Zellen/Kammer (MW1). Diese Werte berechnen sich aus den in dem im Ergebnisteil berechneten Quantilen (s. Kap 3.2) geteilt durch den Faktor 22,22, welcher verwendet wurde, um aus den pro Kammer gezählten Ereignissen die Einheit Zellen/ $\mu$ l angeben zu können (s. Kap. 2.2.1). Es werden also häufig zu wenige Ereignisse ausgewertet, um einen akzeptablen Variationskoeffizienten gewährleisten zu können. Man könnte die analysierte Fläche (Scan-Area) vergrößern, doch es wird bereits die gesamte Kammer analysiert. Durch die Berechnung des Mittelwertes kann man sagen, dass man etwa doppelt so viele Zellen auswertet, da man den Mittelwert aus der oberen und unteren Kammer -  $(O1+U1)/2=MW$  - berechnet, z.B.  $(49 \text{ Zellen} + 51 \text{ Zellen})/2 = 50 \text{ Zellen}$ . Somit hat man insgesamt  $51+49=100$  Zellen ausgezählt. Diese Zahlen ergeben dennoch in den seltensten Fällen mehr als die geforderten 100 Zellen, da nicht einmal das 75%-Quantil der Lymphozyten-Subpopulationen an die 50 Zellen/Kammer heranreicht. Durch Aufkonzentrierung der Blutproben wäre eine Optimierung möglich. Dann läge allerdings ein dual-platform Ansatz vor, da ein Aufzentrifugieren der Blutprobe nötig wäre, welcher ja gezielt vermieden wurde. Eine andere Alternative wäre die weniger starke Verdünnung der Blutprobe, statt auf 1:20 auf beispielsweise 1:5. Die Verdünnung wurde 1:20 gewählt, da man eine Lyse der Erythrozyten durchführen wollte. Ein Lyse-Vorgang, der aus laborinternen Studiengründen durchgeführt wurde, ist bei retrospektiver Betrachtung allerdings nicht nötig.

- Diese Methode ist **nicht automatisiert**, wie die Zählung mittels Hämatologieautomaten oder durch FCM. Dadurch liegt der Zeitaufwand bei dieser Methode über dem Zeitaufwand dieser Routinemethoden. Verkürzen könnte man den Zeitaufwand von 15 Minuten auf ca. 7 Minuten, indem man einen Laser ausstellt. Bei dieser Fluorochrom-Kombination war allerdings ein Einsatz beider am LSC integrierten Laser von Nöten. Der Arbeitsaufwand der Auszählung mittels LSC liegt allerdings unter dem Arbeitsaufwand der manuellen Auszählung mit der Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop.
- Diese Methode besitzt keine CE-Kennzeichnung und ist somit nach den In-vitro-Diagnostik-Richtlinien per se nur für Forschungszwecke und nicht zur In-vitro-Diagnostik zugelassen. Wird sie in der In-vitro-Diagnostik eingesetzt, muss der Laborleiter analog zu kommerziellen Herstellern von CE-markierten Produkten die komplette Evaluierung und das Qualitätsmanagement selbst durchführen, und die erstellen Ergebnisse verantworten

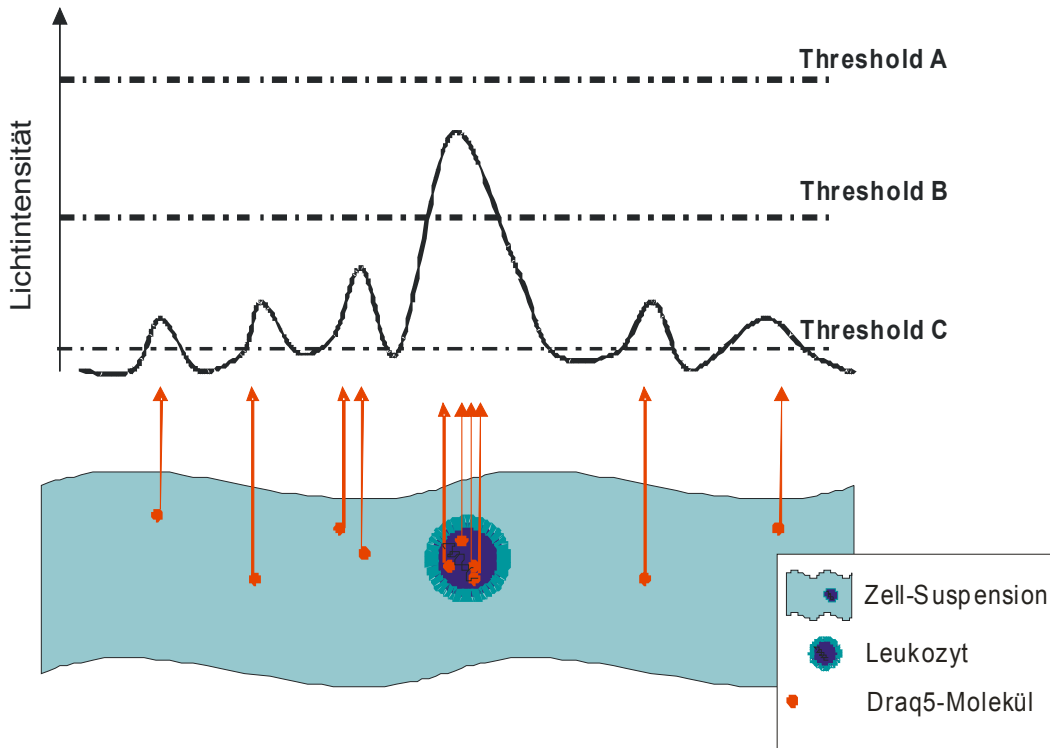
(Gruber, 2007). Daher ist es auch nicht nötig, sich bei dieser Methode an die vom Hersteller optimale Verdünnung der Antikörper zu halten. Durch Austitrieren könnten so andere Antikörper-Blut-Konzentrationen als 1:20 zur Anwendung sinnvoll sein. So könnten sich weitere Reagenzien einsparen lassen, es könnte sich aber auch zeigen, dass mehr Reagenzien verwendet werden sollten. Gruber (2007) schreibt, dass die verwendete Antikörper-Menge zwischen 1-10 $\mu$ l liegen sollte. **Weniger als 1  $\mu$ l** sind meist nicht sehr genau pipettierbar. Für die Antikörper-Fluorochrom-Konjugate wurden bei der hier angewandte Methode 0,5 $\mu$ l verwendet.

- Die **Lagerung der Zellen bei 4° C im Kühlschrank** für 15 min während der Analyse des ersten Scans könnte zu Zellzahlveränderung führen. Gruber 2007 beschreibt ein selektives Absterben und Verlust der CD4<sup>+</sup> Zellen gegenüber den CD8<sup>+</sup> Zellen bei niedrigen Temperaturen. Hierbei wurde versucht durch die niedrigen Temperaturen den Lysevorgang durch den Lysepuffer möglichst gering zu halten. Mögliche selektive Verschiebungen einzelner Leukozyten-Subpopulationen sind dadurch möglich, wenngleich auch unwahrscheinlich, da der Rest-Ansatz (ca. 190  $\mu$ l) höchstens 15 Minuten bei 4°C im Kühlschrank lagert.

#### 4.4 TRIGGERN AUF Draq5<sup>TM</sup>

In dieser Arbeit wurde Draq5<sup>TM</sup> (Alexis Corporation; Lausen, Schweiz) als Trigger benutzt. Durch das Trigger-Signal wird der WinCyte-Software Version 3.7 signalisiert, welche Signale der, in diesem Falle vier PMTs des LSC, als Zelle angesehen werden soll. Die Draq5<sup>TM</sup>-Moleküle emittieren auf Anregung durch einen Laser. Die Emissionen werden vom PMT #4 zu digitalen Ausgangssignalen generiert und zum Computer geleitet, der diese Signale mit Hilfe der WinCyte-Software Version 3.7 auswertet und als „Pixelwolken“ abbildet. Diese „Pixelwolke“ eines Scan-Bildes wird von der Software umrandet (contouring). Das Programm erkennt diese Umrandung nun als Zelle (Abbildung 15). So definiert man der Software, was als eine Zell-Einheit angesehen werden soll. Nur aus diesen Bereichen werden dann auch die Signale der verbleibenden drei PMTs wie R-PE-Intensität (CD3), Alexa488-Intensität (CD4) und Tricolor-Intensität (CD8) abgespeichert. Würde man auf das R-PE-Signal (CD3) triggern, würde eine viel geringere

Zellzahl gezählt. Die Informationen der CD3<sup>-</sup>-Zellen ginge verloren, obwohl diese Zellen vielleicht CD8<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup> sind. Dies verhindert auf der anderen Seite, dass „Pixelwolken“ ohne Interesse weiter analysiert werden. Wollte man nur T-Lymphozyten (alle CD3<sup>+</sup>) auswerten, wäre es eine sinnvolle Vorgehensweise, auf CD3-R-PE zu triggern.



**Abbildung 16** Triggern mit Draq5<sup>TM</sup> nach Anregung durch einen Laser; Darstellung der Draq5<sup>TM</sup>-Lichtintensität in Abhängigkeit von der Bindung an dsDNA, mit Angabe exemplarischer Threshold-Konfigurationen: Threshold A ist zu hoch eingestellt; Threshold B ist optimal eingestellt; Threshold C ist zu schwach eingestellt. Zu bedenken ist eine Signalintensivierung von Draq5<sup>TM</sup> nach der Verbindung mit dsDNA

Das Draq5<sup>TM</sup> wird dem Vollblut zugegeben und zu großen Teilen von den kernhaltigen Zellen aufgenommen. Da ein no-wash-Ansatz vorliegt, wird das verbleibende Draq5<sup>TM</sup> nicht ausgewaschen und verbleibt in der Flüssigkeit. Da aber auch ungebundenes Draq5<sup>TM</sup> durch Laserlicht angeregt wird, ist es nötig, dem Computer zu definieren, ab welcher Lichtintensität er ein Trigger-Signal setzen soll (Threshold, Abbildung 16). Stellt man den Threshold zu niedrig ein (Abbildung 16, Threshold C), so wird das gesamte Scan-Bild als eine Zell-Einheit betrachtet, und es ist nicht möglich, einzelne Zellen voneinander zu trennen. Setzt man den Threshold zu hoch (Abbildung 16, Threshold A) ein, wird keine Zelle mehr erkannt. Von Vorteil ist dabei, dass Draq5<sup>TM</sup>, sobald es an doppelsträngige DNA (dsDNA) gebunden hat, seine Intensität gegenüber ungebundenem Draq5<sup>TM</sup> vervielfacht. Während der Analyse der Blutleukozyten für diese Arbeit



war es möglich, den einmal eingestellten Threshold die ganze Zeit über beizubehalten (Kap. 2.2.2).

Es werden auch andere Methoden zum Triggern benutzt. Häufig wird auf den Forward-Scatter (FSC) getriggert (Abbildung 2, Abbildung 3). Das ist auch das am einfachsten zu verstehende Prinzip. Sobald ein Anregungslichtstrahl (Laser) auf eine Zelle strahlt, entsteht Streulicht längs zum Anregungslichtstrahl. So ist es möglich, Zellen aufgrund ihrer Größe zu unterscheiden, da die Lichtbrechung proportional zur Zellgröße ist. Es nicht nötig die Zellen mit einem Fluoreszenz-Farbstoff anzufärben.

Alternativ stehen aber auch noch weitere Fluorochrome zur Verfügung, die zur Kernfärbung verwendet werden können und in der FCM, bzw. SBC eingesetzt werden:

**Draq5<sup>TM</sup>** ist ein Zellwand-permeabler Stoff, mit dem sich lebende Zellen zuverlässig anfärben lassen (Martin et al., 2005), aber auch fixierte Zellen. Der Vorteil dieses Stoffes ist die Peak-Emissionswellenlänge von 681-697nm im Infrarot-Bereich. So lässt sich dieser Farbstoff gut mit anderen Fluoreszenzfarbstoffen kombinieren. Die Exzitationswellenlänge liegt zwar optimalerweise bei 633 nm (HeNe-Laser), aber es lässt sich auch mit dem Argon-Laser (488 nm) und anderen Lasern anregen (s. Abbildung 1). Es ist noch ein recht neuer Farbstoff, der erstmals 1999 von Smith et al. in der Anwendung beschrieben wurde.

**Propidiumiodid (PI)** ist wie Ethidiumbromid (EtBr) ein DNA-Interkalator und wurde als anti-Trypanosomen-Medikament in der Antibiotikatherapie entwickelt, zu diesem Zweck aber nicht eingesetzt (Waring, 1975). Heute wird dieser fluoreszierende DNA-Farbstoff hauptsächlich in der FCM bei Apoptoseuntersuchungen eingesetzt (Riccardi und Nicoletti, 2006). Es färbt allerdings nur tote Zellen an.

**DAPI** ist ein hervorragender Farbstoff für die Färbung von DNA. Ursprünglich war nur die spezifische Bindung an AT-Basenpaare ohne Interkalation von DAPI bekannt (Kapuscinski und Szer, 1979), später wurde aber auch die Interkalation in GC-Basenpaare nachgewiesen (Wilson et al., 1989). Praktische Bedeutung hat DAPI z.B. als Nachweisreagenz von Mycoplasmen- oder Virus-DNA in der Zellkultur. Aber auch zur DNA-Färbung beim Einsatz des LSC kann DAPI angewendet werden (Pozarowki et al., 2004). Eine Lebendzellfärbung ist möglich.

Der bei Hoechst entwickelte **Farbstoff H33258** wird häufig als Alternative zu DAPI zur Färbung von DNA verwendet. Er kann für Lebendzellen eingesetzt werden. Der Farbstoff bindet

bevorzugt an AT-reiche Sequenzen (Stokke und Stehen, 1985) und kann zu Lesefehlern in der Mitose und vielkernigen Zellen führen (Hilwig & Group, 1973). RNA wird durch den Farbstoff nicht gefärbt (Labarca und Paigen, 1980). Neben der Histochemie ist H33258 auch für die DNA-Färbung bei der Gelelektrophorese geeignet. Eine weitere Anwendung findet der Farbstoff bei der Bestimmung von 'covalent cross-linked' (ccl) DNA. H33258 färbt doppelsträngige DNA sehr stark und DNA mit falschen (mispairod) Basenpaaren sehr schwach (Penketh et al., 1997). Dieser Farbstoff wurde aber auch schon in der slide-based Cytometry (SBC) eingesetzt (Bocsi et al., 2004). Ein anderer Farbstoff von Hoechst ist H33342, der ebenfalls für Lebendzellen eingesetzt werden kann.

**7-Aminoactinomycin (7-AAD)** ist ein DNA-Farbstoff, der, wie PI, ausschließlich die DNA von toten Zellen anfärbt. Die Stammverbindung ist das Actinomycin D oder Dactomycin (LYOVAC-COSMEGEN<sup>®</sup>), ein zytotoxisches Antibiotikum, welches als Zytostatikum in der Tumorthapie angewendet wird (www.rote-liste.de). 7-AAD lässt sich aber auch gut in der SBC einsetzen (Laffers, 2004). Es besitzt die Eigenschaft, die Granulozyten und die Lymphozyten auf Grund ihrer Chromatinstruktur in zwei Populationen aufzutrennen. Granulozyten als polymorphonukleäre Zellen binden dabei mehr 7-AAD als mononukleäre Zellen wie Lymphozyten (Stokke und Stehen, 1987; Loborg et al., 1995).

DNA-Farbstoff	Exzitation [nm]	Peak-Emission [nm] nach Bindung	Zell-status	Anmerkungen
Draq5 <sup>TM 3)</sup>	633 (rot)	681-697 (rot)	living, fixed	
PI <sup>1),4)</sup>	535 (grün)	617 (orange)	fixed	bleicht langsam
DAPI <sup>1),2),4)</sup>	~365 (UV)	dsDNA: 450-460 (blau) RNA: ~500 (hellblau)	living	schnelles bleichen
H 33258 <sup>2),1)</sup>	~355 (UV)	DNA: ~460 (blau) RNA: Ø	living	Alternative zu DAPI
7-AAD <sup>4)</sup>	546 (grün)	ssDNA: 647 (rot)	fixed	

**Tabelle 18 Ausgewählte DNA-Farbstoffe und Ihre Eigenschaften bei der Zellfärbung; Angabe von Exzitationswellenlänge, Peak-Emission, und Zellstatus zur Zellfärbung (Produktinformation: <sup>1)</sup>AppliChem GmbH, Darmstadt, BRD, <sup>2)</sup>Sigma, Saint Louis, MO, USA, <sup>3)</sup>Caltag, Burlingame, CA, USA <sup>4)</sup>Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)**

#### 4.5 PERSPEKTIVEN

Die Methode der Objektträger-basierten Zytometrie (SBC) hat sich als zuverlässig erwiesen, wie in 4.3 VOR- UND NACHTEILE DES LSC dargelegt wurde. Der große Vorteil dieser Methode ist der minimale Reagenzienverbrauch durch die kleine zu analysierende Blutmenge. Dies ist laut Chin et al. (2006) eine Voraussetzung für Lab-on-a-chip (LOC) devices. LOC devices steht für Labor-auf-einem-Chip Apparate, und meint kleine Apparate, die Laboruntersuchungen durchführen können. Am bekanntesten sind in Deutschland wohl die Blutzucker-Messgeräte, die von den Krankenschwestern täglich benutzt werden, um den Blutzuckerwert des Patienten durch einfache kapillare Blutentnahme am Bettrand zu bestimmen. Dies wird auch point-of-care (POC) Testung genannt, da das Ergebnis noch am Bettrand, dem Ort des Interesses, vorliegt. Beispielhaft sei hier das Blutzucker-Messgerät Accu-Chek Aviva der Firma Accu-Chek® genannt. Man verspricht sich von LOC devices eine Verbesserung der Gesundheit der globalen Menschheit, vor allem in den Entwicklungsländern, die sich mit ihren Ressourcen meist nicht teure Apparate oder hohen Verbrauchskosten leisten können (Chin et al., 2006).

Weitere Voraussetzungen für LOC devices, neben dem wenigen Volumen für die Analysen, sind kleine Geräte und eine schnelle Analyse. Diese drei Voraussetzungen sind zweifelsfrei bei den Blutzucker-Messgeräten erfüllt, treffen aber auf die Leukozytenzählung mit Hilfe eines LSC nicht zu. Für LOC devices sind vor allem Geräte interessant, die in den Entwicklungsländern (und somit für den Großteil der Menschheit) zur Diagnostik von Krankheiten mit einer großen Belastung für die Gesellschaft dieser Regionen beitragen (Chin et al., 2006).

Eine Indikationen für die CD4 und CD8 Zählung ist vor allem in der HIV-Diagnostik. Dort hat sie einen großen Einfluss auf Therapie-Entscheidung und Progress-Beurteilung (s. Kap 1.1.2). Darum hat auch die absolute CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten-Zählung in Ressourcen-limitierten Ländern einen hohen Stellenwert in der Forschung. Dazu gibt es in der Forschung viele Ansätze. Der Goldstandard für die Lymphozyten-Subpopulationsanalyse ist die Flow Cytometry (FCM). Diese Methode ist allerdings auch eine sehr teure. Eine herkömmliche Zellzählung der CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten wird pro Test mit rund 100€ angegeben (Eberle, 2006). Darum sind gerade hier alternative Verfahren gesucht. So berichten beispielsweise Cheng et al. (2007) von einem Microchip zur CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten-Zählung, Chen et al. (2007) berichteten über indirekte Marker, u.a. eine Lymphozytenzahl unter 1200/μl, die mit einer reduzierten CD4<sup>+</sup>-Lymphozytenzahl übereinstimmen. Nouanthong et al. (2006) berichten über Latex-Beads, welche

mit MT4 MAb besetzt waren, und so zu einer lichtmikroskopischen Rosettenbildung von CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten führte. Die Firma Partec entwickelten ein Flow-cytometer (FCM), welches klein und robust ist und zuverlässig Fluoreszenz-Färbungen durchführt. Außerdem erlaubt dieses Gerät eine zuverlässige absolute Zellzählung (Mansa et al., 2007; Lyen et al., 2006; Zijenah et al., 2006; Dieye et al., 2005; Cassens et al., 2004). Bei der letztgenannte Methode werden besonders die niedrigen Anschaffungs- und Verbrauchskosten hervorgehoben, sowie das einfache „no-lyse-no-wash“ Handling (siehe auch Kap. 4.3).

Ganz neu (Oktober 2006), und noch nicht in der Fachliteratur auf seine Zuverlässigkeit überprüft, ist der von Chin et al. (2006) erwähnte CD4Now(TM)-Point-of-care-Analyzer zur CD4<sup>+</sup>-Lymphozytenzählung. Auf [www.labnow.com](http://www.labnow.com) (06.09.2007) wird von einem Gerät in Toaster-Größe berichtet. Unter <http://www.aegis.org/news/bw/2004/bw041001.html> (06.09.2007) kann man nachlesen, dass dieses Gerät schnell und kostengünstig ist und mit einem Tropfen Blut die absolute CD4<sup>+</sup>-Zählung ermöglicht.

Um die absolute CD4<sup>+</sup>-Lymphozytenzählung mit Hilfe des LSC und der Neubauer-Zählkammer in diese Liste einfügen zu können, wäre es nötig, das LSC günstiger, robuster und kleiner zu machen. Es gibt bereits Überlegungen, mit einer Laserdiode und einem Photodetektor, mit Gesamtkosten unter 45 US\$, eine günstige Variante eines Signaldetektors herzustellen (Sia et al., 2004). Die Whitesides Research Group berichtet vom „*POCKET Immunoassay*“, mit einer Laserdiode der Wellenlänge 654nm als Lichtquelle und einem sog. „optical integrated circuit“ als Detektor. Das Ganze wird mit einer 9V-Batterie betrieben (Sia et al., 2004). Eine point-of-care (POC) Anwendung ist allerdings damit sicherlich nicht möglich, da auch dieses günstige, robuste und kleine „Mini-LSC“ einen festen Standplatz bräuchte.

Dass nur ein Laser zur Verfügung stünde, würde dabei möglicherweise noch nicht einmal ein Problem darstellen, da die drei in dieser Methode benutzten Fluorochrome alle mit dem gleichen Laser angeregt werden (Argon-Laser, 488 nm), und sich Draq5<sup>TM</sup> ebenfalls mit diesem Laser anregen lässt. Lediglich die Signaldetektion stellt Probleme dar, da alle Fluorochrome gleichzeitig angeregt werden und somit auch gleichzeitig Emissionssignale aussenden. Mit dem LSC werden diese Emissionssignale mit Farbfiltern auseinander gehalten, und so in vier verschiedene Detektoren, den PMTs, gelenkt. Falls nur ein PMT zur Signaldetektion zur Verfügung stünde, so wäre es nötig, die Neubauer-Zählkammer wiederholt zu scannen, und zwischen den Scans die Filter zur Fluorochromanalyse auszuwechseln, wie in Kap. 4.3

beschrieben. Oder es wäre ein Detektor nötig, der in der Lage wäre, die verschiedenen Farben der Fluorochrome auf einmal zu erkennen.

Wie schon von Bocsi et al. 2004 dargelegt wurde, stellt bei dem LSC die automatisierte Fokussierung noch ein Problem dar. Dies ist bisher nicht möglich. Die mikroskopische Analyse der Zellen mit dem Auge kann auch einen Vorteil darstellen (Clatch und Foreman, 1998), ist bei dieser Methode außer zur Fokussierung aber ohne Belang.

Um das Mischen der Reagenzien mit dem Blut zu vereinfachen, wären „Chips“ denkbar, die bereits mit den Fluorochrom-Antikörper-Konjugaten beladen wären, und nur noch mit der zu analysierenden Substanz, in diesem Falle Blut, in Kontakt gebracht werden müssten. Es sind eine Reihe von „Chips“ denkbar, so z.B. das ORCA Microfluidics™ -System der Firma Micronics (<http://www.micronics.net/technologies/orca.php>), welches bei Tüdós et al. (2001) erwähnt wird. Doch dies würde die Verbrauchskosten dieser Methode nur erhöhen, da auch dieser Chip nicht kostenlos ist. Sinnvoller ist es sicherlich, fertige Reagenzien-Kits zur Verfügung zu stellen, die nur noch mit dem Blut vermischt werden müssen und dann möglicherweise noch von Hand in die Kammer pipettiert werden müsste. Die Zählkammern an sich, wie z.B. die Neubauer-Zählkammer, sind in Labors der ganzen Welt ubiquitär vorhanden, da sie zum Grundinventar eines zur Zellzählung befähigten Labors gehören.

Sollten also alle Probleme gelöst sein, wäre es also möglich, mit diesem „Mini-LSC“ und einer Neubauer-Zählkammer bei minimalem Reagenzienverbrauch und minimalem Blutvolumen (evtl. kapilläre Blutentnahme am Finger) eine CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Lymphozytenzählung durchzuführen. Dies wären zusammengefasst die optimalen Voraussetzungen, um sich am hart umkämpften Markt der CD4-Analyser durchzusetzen, zumal diese Methode nicht auf die CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten-Subpopulation beschränkt wäre. Auch andere Antikörper, die mit den gleichen oder ähnlichen Fluorochromen konjugiert sind, lassen sich so benutzen. So könnte auch diese Methode einen Beitrag zur globalen Verbesserung der Gesundheit leisten.

## **5) ZUSAMMENFASSUNG**

Die absolute Zellzählung spielt in der modernen Medizin eine große Rolle. Sie erlaubt es dem Kliniker, den Status der Immunabwehr zu erfahren. Dabei spielen die Lymphozyten-Subpopulationen der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten in Diagnostik, Therapieentscheidung und Prognose bei HIV, angeborenen Immundefekten, Sarkoidose, exogen allergische Alveolitis und bei den unterschiedlichen Leukämieformen eine entscheidende Rolle. Aber auch in der Forschung, insbesondere in der Onkologie, sind diese Lymphozyten-Subpopulationen von hohem Interesse. Der Goldstandard zur Analyse dieser Lymphozyten-Subpopulationen ist die Immunphänotypisierung mittels Flow Cytometry (FCM). In dieser Arbeit wird eine interessante Methode präsentiert, die ein altes Werkzeug der absoluten Zellzählung, die Neubauer-Zählkammer, mit einem modernen Mikroskop, dem Laser-Scanning-Cytometer (LSC) der Firma CompuCyte (Cambridge, MA, USA), kombiniert. Dies wird auch als slide-based Cytometry (SBC) verstanden.

Es wurden 10µl Vollblut, welches bei einer routinemäßigen Blutentnahme bei 119 Patienten gewonnen wurde, mit jeweils 0,5 µl CD3-R-PE, CD4-Alexa 488 und CD8-Tricolor (alle Caltag, Burlingame, CA, USA) und 1,0µl Draq5<sup>TM</sup> (Alexis Corporation, Lausen, Schweiz) vermischt. Nach 15 Minuten Lagerung bei Raumtemperatur wurden 188,0 µl Quicklysis<sup>TM</sup> Lysing Solution (Cytognos; Salamanca, Spanien) hinzu gegeben und nach weiteren 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur analysiert (erster Scan). Eine zweite Analyse wurde zum Inter-Scan-Vergleich nach 15 Minuten Inkubation bei 4°C durchgeführt (zweiter Scan). Zur Analyse wurde der Ansatz in eine herkömmliche Neubauer-Zählkammer pipettiert. Diese ermöglicht es, durch die Zellzählung auf einer vorgegebenen Fläche durch die konstante Höhe auf das Volumen zurück zu schließen. Zur Zellzählung wurde ein LSC verwendet, welches jeweils die obere und die untere Kammer der Neubauer-Zählkammer analysiert, was den Intra-Scan-Vergleich ermöglicht.

Es hat sich gezeigt, dass diese Methode Ergebnisse für die Leukozytenzählung liefert, die durchaus mit den im Routinelabor erhobenen Daten mit dem Hämatologie-Automaten Sysmex XE-2100 (Sysmex, Kobe, Japan) vergleichbar sind. Für Leukozyten zeigte sich eine Korrelation im ersten Scan von  $r_{\text{Leukos}}(\text{MW1-RL})=0,895$ , und im zweiten Scan von  $r_{\text{Leukos}}(\text{MW2-RL})=0,929$ .

Im Vergleich der Leukozytenzahlen zeigten die Intra-Scan-Vergleiche im ersten und im zweiten Scan Korrelationen von  $r > 0,85$ , nämlich  $r_{\text{Leukos}}(\text{O1U1})=0,874$  und  $r_{\text{Leukos}}(\text{O2U2})=0,856$ . Im

Inter-Scan-Vergleich zeigte sich eine ebenfalls exzellente Korrelation von  $r_{\text{Leukos}}$  (MW1-MW2)=0,935.

Für die Lymphozyten-Subpopulationen zeigte sich bei der CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten-Subpopulation eine gute Intra-Scan-Korrelation von  $r_{\text{CD3}}(\text{O1U1})=0,866$  und  $r_{\text{CD3}}(\text{O2U2})=0,860$ . Im Inter-Scan-Vergleich zeigte sich eine sehr gute Korrelation von  $r_{\text{CD3}}$  (MW1-MW2)=0,903.

Für die T-Lymphozyten-Subpopulationen zeigte sich bei der CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten-Subpopulation eine gute Intra-Scan-Korrelation von  $r_{\text{CD4}}(\text{O1U1})=0,837$  und  $r_{\text{CD4}}(\text{O2U2})=0,826$ . Im Inter-Scan-Vergleich zeigte sich eine gute Korrelation von  $r_{\text{CD4}}$  (MW1-MW2)=0,883.

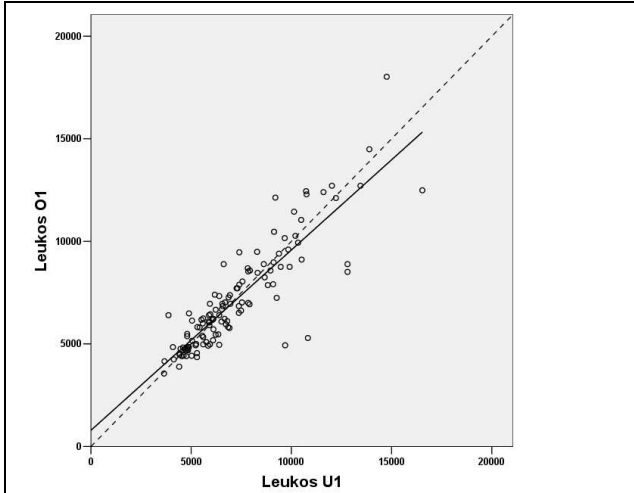
Für die T-Lymphozyten-Subpopulationen zeigte sich bei der CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten-Subpopulation eine Intra-Scan-Korrelation von  $r_{\text{CD8}}(\text{O1U1})=0,878$  und  $r_{\text{CD8}}(\text{O2U2})=0,880$ . Im Inter-Scan-Vergleich zeigte sich eine gute Korrelation von  $r_{\text{CD8}}$  (MW1-MW2)=0,899.

Es zeigten sich einige Software-spezifische Probleme. Die WinCyte-Software Version 3.7 war nicht dazu in der Lage, einige Zellen der zu analysierenden Region als Zellen zu identifizieren. Es kam zur Doublettenbildung; das erste zum analysierten Bereich der Kammer gehörende Scan-Bild wurde nicht ausgewertet; randständige Zellen wurden „übersehen“. Zur Lösung dieser Probleme entschied man sich, diese „verlorenen“ Zellen nicht weiter zu beachten. Dabei muss man bedenken, dass die so berechneten Zellzahlen unter den tatsächlich vorhandenen Zellzahlen liegen.

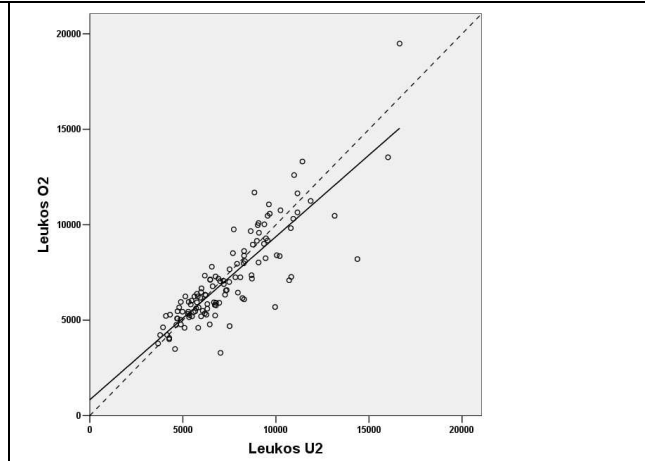
Vorteile dieser Methode liegen in der Analyse sehr kleiner Blutmengen (10µl), wodurch man wenig Reagenzienverbrauch hat und so kostengünstig arbeiten kann. Es ist eine einfache Methode, da eine single-platform vorliegt und sich durch den lyse-no-wash Ansatz diese Methode als zuverlässig zeigt. Die Nachteile ist das seltene Vorhandensein eines LSC im Routinelabor. Problematisch ist auch die geringe Blutmenge, die analysiert wird, lediglich eine Fläche von 0,9mm<sup>3</sup>, in der der Ansatz 1:20 verdünnt vorliegt. Dadurch kommt es zu mitunter hohen Variationskoeffizienten.

Es wäre aber denkbar, durch eine Miniaturisierung des LSC so eine kostengünstige, einfach erlernbare Methode der absoluten Leukozyten-Subpopulations-Analyse zu schaffen, und so einen Beitrag zur Verbesserung der Versorgung v.a. von HIV-Patienten in Ressourcen-limitierten Ländern zu schaffen.

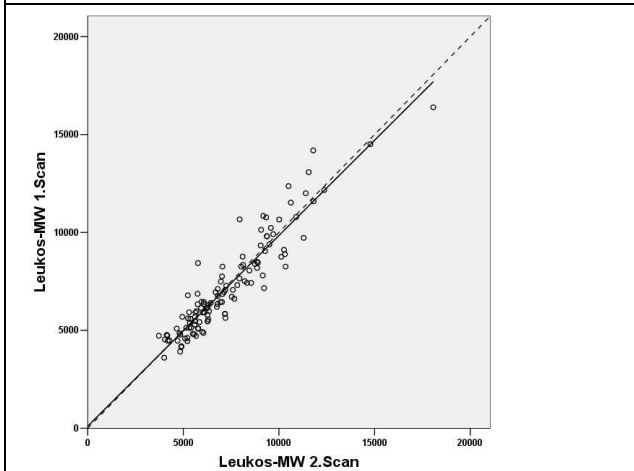
## 6) REGRESSIONSGERADEN UND BLAND-ALTMAN-DIAGRAMME



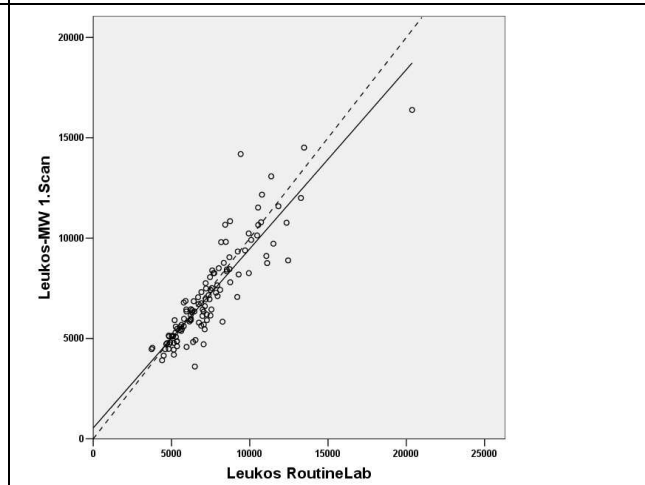
**Abbildung 17 Regressionsgerade - Leukos O1-U1:**  
 $y=0,87x+1019$ ;  $r=0,874$  ,  $R^2=0,76$



**Abbildung 18 Regressionsgerade - Leukos O2-U2:**  
 $y=0,86x+1266$ ;  $r=0,856$  ,  $R^2=0,73$

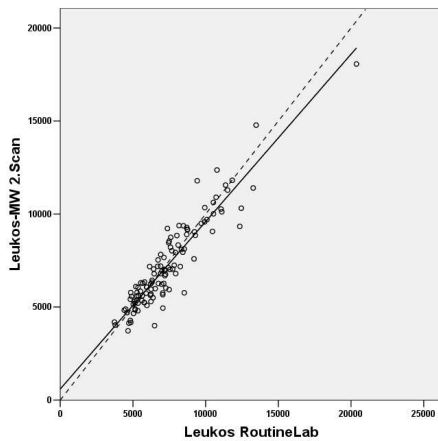


**Abbildung 19 Regressionsgerade –**  
**Leukos MW1-MW2:**  $y=0,90x+823$ ;  $r=0,935$  ,  $R^2=0,87$

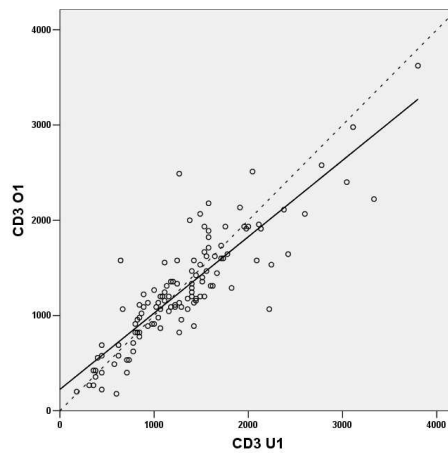


**Abbildung 20 Regressionsgerade - Leukos MW1-RL:**  
 $y=0,89x+543$ ;  $r=0,895$  ,  $R^2=0,80$

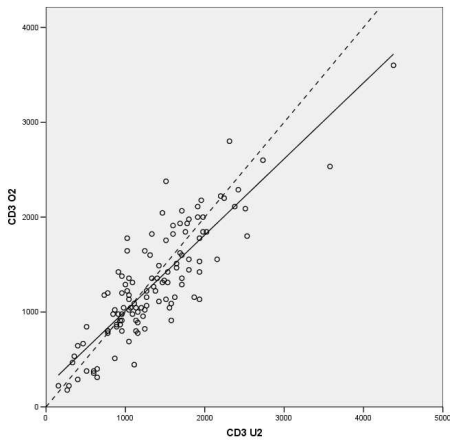




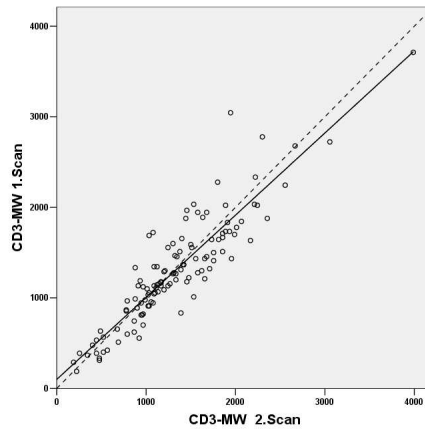
**Abbildung 21 Regressionsgerade - Leukos MW2-RL:**  
 $y=0,90x+592$ ;  $r=0,929$ ,  $R^2=0,86$



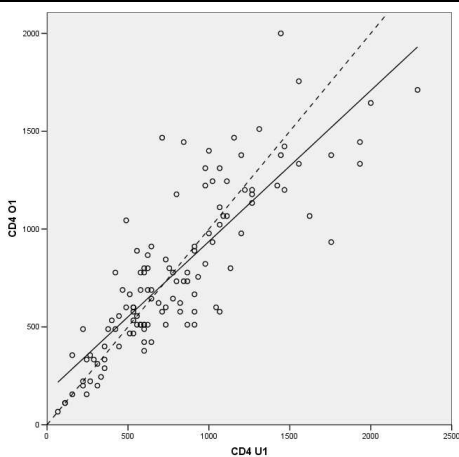
**Abbildung 22 Regressionsgerade - CD3 O1-U1:**  
 $y=0,93x+122$ ;  $r=0,866$ ,  $R^2=0,75$



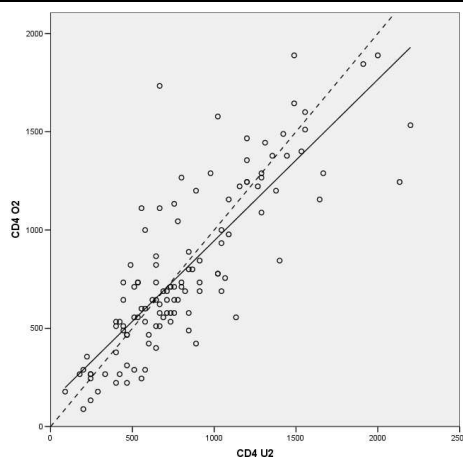
**Abbildung 23 Regressionsgerade - CD3 O2-U2:**  
 $y=0,92x+160$ ;  $r=0,860$ ,  $R^2=0,74$



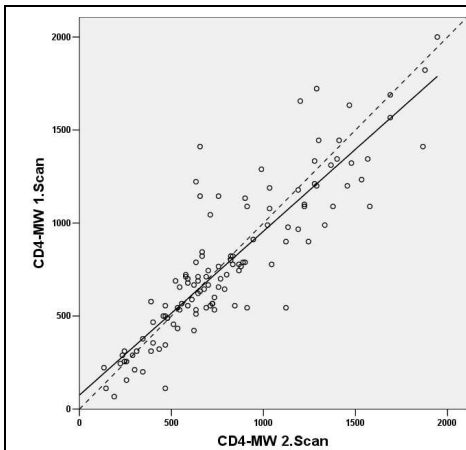
**Abbildung 24 Regressionsgerade - CD3 MW1-MW2:**  
 $y=0,90x+155$ ;  $r=0,903$ ,  $R^2=0,82$



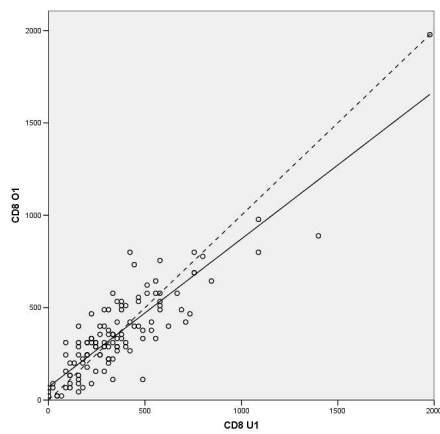
**Abbildung 25 Regressionsgerade - CD4 O1-U1:**  
 $y=0,91x+89$ ;  $r=0,837$ ,  $R^2=0,70$



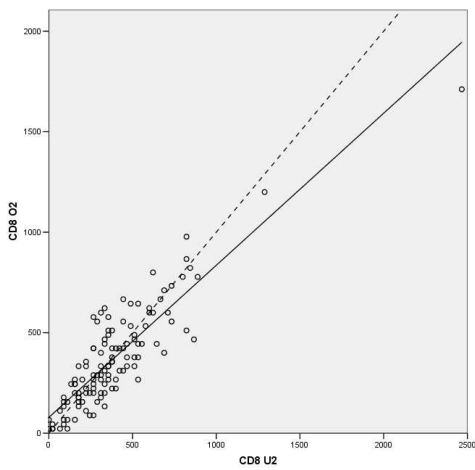
**Abbildung 26 Regressionsgerade - CD4 O2-U2:**  
 $y=0,83x+159$ ;  $r=0,826$ ,  $R^2=0,68$



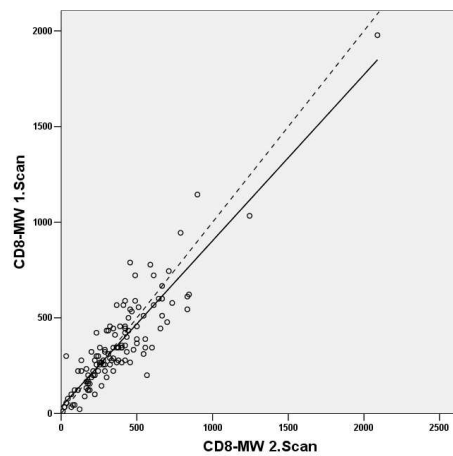
**Abbildung 27 Regressionsgerade - CD4 MW1-MW2:**  
 $y=0,88x+114$ ;  $r=0,883$ ,  $R^2=0,78$



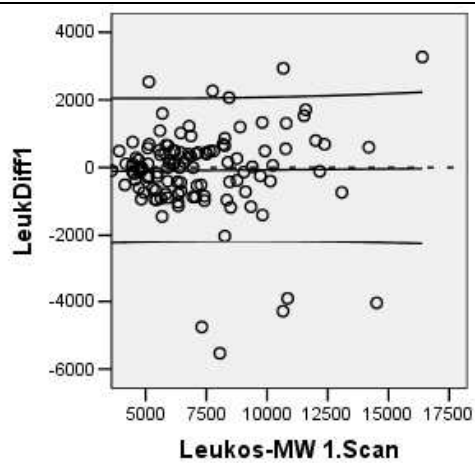
**Abbildung 28 Regressionsgerade - CD8 O1-U1:**  
 $y=0,96x+15$ ;  $r=0,878$ ,  $R^2=0,77$



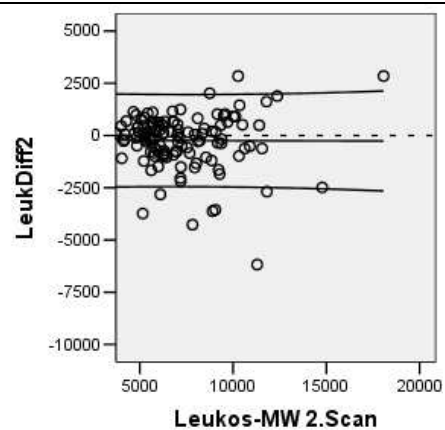
**Abbildung 29 Regressionsgerade - CD8 O2-U2:**  
 $y=1,02x+7$ ;  $r=0,880$ ,  $R^2=0,77$



**Abbildung 30 Regressionsgerade - CD8 MW1-MW2:**  
 $y=0,93x+40$ ;  $r=0,899$ ,  $R^2=0,81$



**Abbildung 31 Bland-Altman-Diagramm**  
**Leukos O1-U1:  $y=0,01x-128$**



**Abbildung 32 Bland-Altman-Diagramm**  
**Leukos O2-U2:  $y=0,00x-128$**

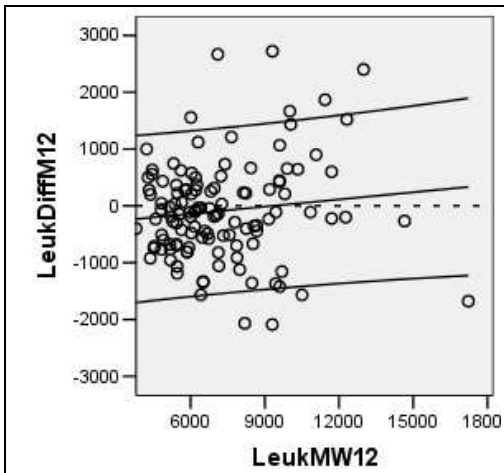


Abbildung 33 Bland-Altman-Diagramm

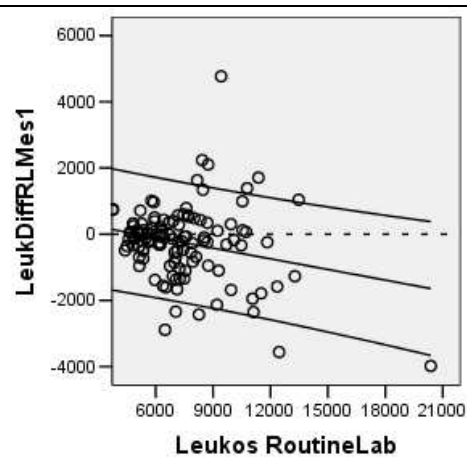
Leukos MW1-MW2:  $y=0,04x-392$ 

Abbildung 34 Bland-Altman-Diagramm

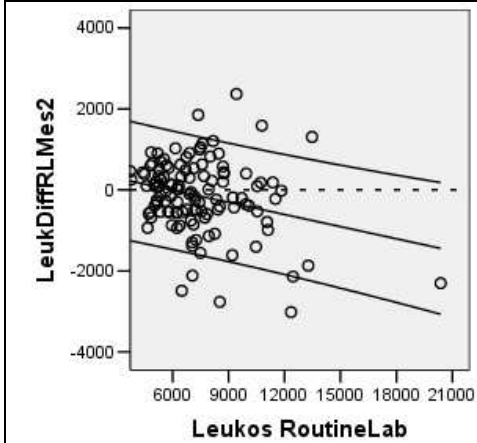
Leukos MW1-RL:  $y=-0,11x+543$ 

Abbildung 35 Bland-Altman-Diagramm

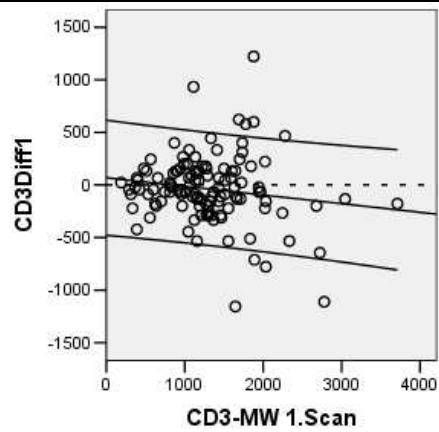
Leukos MW2-RL:  $x=-0,10x+592$ 

Abbildung 36 Bland-Altman-Diagramm

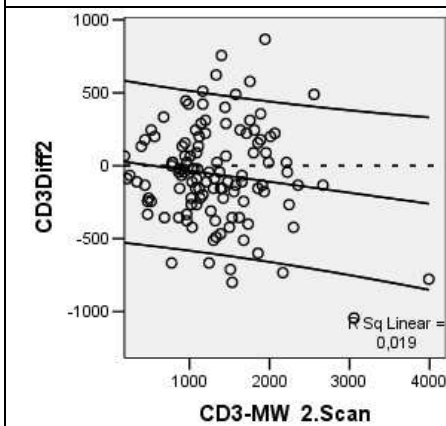
CD3 O1-U1:  $y=-0,08x+69$ 

Abbildung 37 Bland-Altman-Diagramm

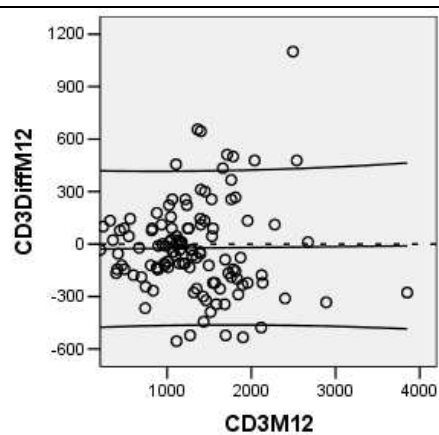
CD3 O2-U2:  $y=-0,08x+41$ 

Abbildung 38 Bland-Altman-Diagramm

CD3 MW1-MW2:  $y=0,00x-30$

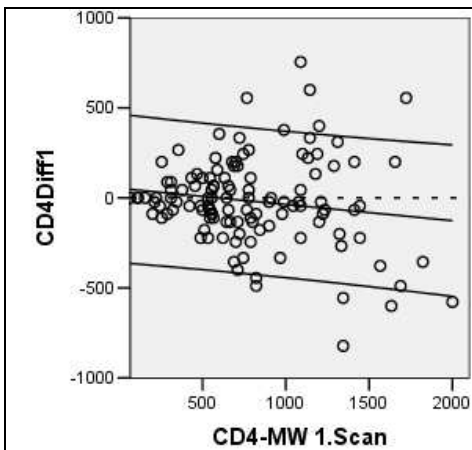


Abbildung 39 Bland-Altman-Diagramm

$$\text{CD4 O1-U1: } y = -0,09x + 53$$

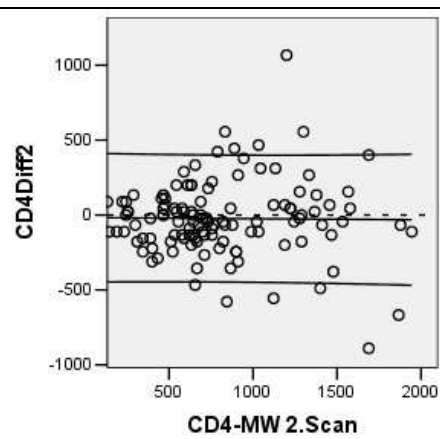


Abbildung 40 Bland-Altman-Diagramm

$$\text{CD4 O2-U2: } y = -0,01x - 17$$

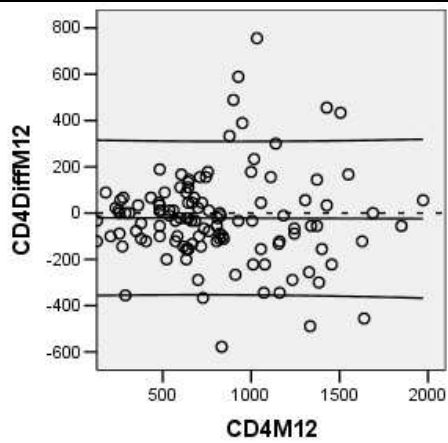


Abbildung 41 Bland-Altman-Diagramm

$$\text{CD4 MW1-MW2: } y = -0,00x - 20$$

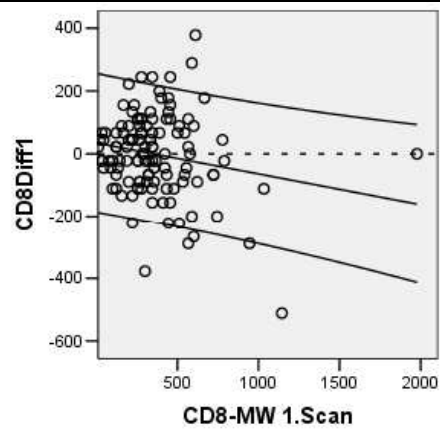


Abbildung 42 Bland-Altman-Diagramm

$$\text{CD8 O1-U1: } y = -0,10x + 35$$

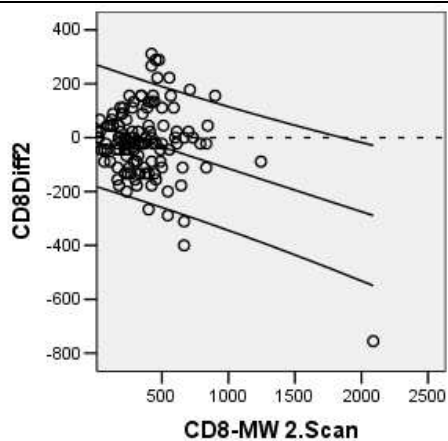


Abbildung 43 Bland-Altman-Diagramm

$$\text{CD8 O2-U2: } y = -0,16x + 45$$

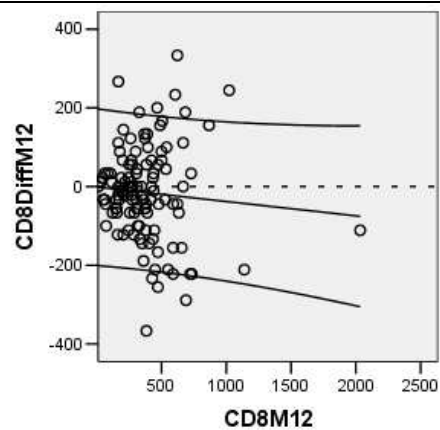


Abbildung 44 Bland-Altman-Diagramm

$$\text{CD8 MW1-MW2: } y = -0,04x - 2$$

## **7) TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1 Übersicht über das Immunsystem, unterteilt in Antigen-spezifische und –unspezifische Immunität, sowie humorale und zelluläre Elemente.....	6
Tabelle 2 Lymphozyten-Subpopulationen und typische Oberflächenmarker zur Immunsotypisierung.....	8
Tabelle 3 Indikationen zum Therapiebeginn bei HIV nach den Deutsch-Österreichischen Empfehlungen 2005, geordnet nach klinischen Kriterien, CD4 <sup>+</sup> -Zellzahl und Viruslast.....	11
Tabelle 4 Indikationen zur Bestimmung von T-Lymphozyten-Subpopulationen und die Wertigkeit in der praktischen Anwendung .....	13
Tabelle 5 Ausgewählte Fluorochrome mit Angabe der Exzitationswellenlänge und der Peak-Emission.....	15
Tabelle 6 Aufschlüsselung der einbezogenen Patienten nach Geschlecht und Erkrankung.....	22
Tabelle 7 Konfiguration der Photomultiplier (PMT), welche zur Analyse mittels LSC benutzt wurden; Reihenfolge von oben nach unten im LSC, entsprechend des Strahlenganges PMT #1 zuerst; jeweils mit Angabe der in dieser Studie verwendeten Farbstoffe, welche mit dem entsprechenden PMT erkannt wurden .....	26
Tabelle 8 Pro Proband und Messung erhobene Daten mittels LSC und Routinelabor (Sysmex XE-2100) und Angabe des Kürzels, welches im Text verwendet wird.....	34
Tabelle 9 Deskriptive Datenanalyse der Leukozytenzählung, geordnet nach Scan, Kammer und Routinelabor.....	36
Tabelle 10 Ergebnisse der Statistischen Datenanalyse der Leukozytenzählung, geordnet nach Intra-Scan-Korrelation, Inter-Scan-Korrelation und Vergleich mit dem Routinelabor .....	37
Tabelle 11 Deskriptive Datenanalyse der CD3 <sup>+</sup> Zellen, geordnet nach Scan und Kammer.....	38
Tabelle 12 Ergebnisse der Statistischen Datenanalyse der CD3-Zählung, geordnet nach Intra- und Inter-Scan-Korrelation .....	39
Tabelle 13 Deskriptive Datenanalyse der CD4 <sup>+</sup> Zellen, geordnet nach Scan und Kammer.....	40
Tabelle 14 Ergebnisse der Statistischen Datenanalyse der CD4-Zählung, geordnet nach Intra- und Inter-Scan-Korrelation .....	40
Tabelle 15 Deskriptive Datenanalyse der CD8 <sup>+</sup> Zellen, geordnet nach Scan und Kammer.....	41
Tabelle 16 Ergebnisse der Statistischen Datenanalyse der CD8-Zählung, geordnet nach Intra- und Inter-Scan-Korrelation .....	41

Tabelle 17 Methodische Fehlerquellen bei der Lymphozytensubtypisierung im peripheren Blut	52
Tabelle 18 Ausgewählte DNA-Farbstoffe und Ihre Eigenschaften bei der Zellfärbung; Angabe von Exzitationswellenlänge, Peak-Emission, und Zellstatus zur Zellfärbung.....	58

## **8) ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: Draq5 <sup>TM</sup> -Emissionswellenlänge in Abhängigkeit von Exzitationswellenlängen ..	16
Abbildung 2 Durchflusszytometer-Schema mit Darstellung des Mantelstroms zur Zell-Separierung und Darstellung des Strahlenganges zur Zell-Analyse nach Inkubation .....	17
Abbildung 3 Strahlengang beim Laser-Scanning-Cytometer; zwei Laser zur Emission von Licht, zusammen mit vier PMTs und dem Scatter-Detector dienen der automatischen Detektion; die manuelle Detektion wird mittels Lichtquelle und CCD-Camera oder dem menschlichen Auge ermöglicht.....	19
Abbildung 4 Schematischer Aufbau eines Blutkörperchenzählers mit Impedanzmessung; veränderte Leitfähigkeit beim Durchtritt einer Zelle durch die kapilläre Öffnung.....	20
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Weiterverarbeitungsvorganges des Patientenblutes; mischen und inkubieren mit Flouorchromen sowie mit Erythrozytenlyserereagenz, anschließendes scannen mit dem LSC, bzw. zwischenlagern im Kühlschrank bei 4°C.....	24
Abbildung 6 Neubauer-Zählkammer im Querschnitt, als Übersicht und in Detailvergrößerung ..	25
Abbildung 7 Gang der Auswertung, nachdem die Signale von den PMTs zum Computer gesendet wurden; Zellzählung beginnend links mit a) Einzelzellseparierung, b) Aufteilung in obere und untere Kammer, c) CD3 <sup>+</sup> -Separierung und d) CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> und CD4 <sup>-</sup> /CD8 <sup>-</sup> -Separierung .....	28
Abbildung 8 Unterschiedliche Funktionen der Regressionsanalyse; Darstellung von (a) linearem Zusammenhang, lineare Funktion und (b) exponentiellem Zusammenhang, quadratische Funktion .....	29
Abbildung 9 Verschiedene Korrelationen einer Regressionsanalyse: positive Korrelation, negative Korrelation und keine Korrelation.....	30

Abbildung 10 Beispiele zur grafischen Darstellung der Regressionsanalyse mit Angabe der zugehörigen Meßwerte.....	31
Abbildung 11 Zwei grafisch dargestellte Bland-Altman-Diagramme mit Angabe der zugehörigen Messwerte, Differenzen der Messwerte und Mittelwerten der Messwerte: Vergleich zweier Messungen durch Auftragen der Mittelwerte gegen die Differenz.....	33
Abbildung 12 Gang der Auswertung zur Analyse der Zuverlässigkeit und Genauigkeit der Messungen - unter Verwendung der Kürzel aus Tabelle 8 - getrennt nach Scan 1 und 2, sowie (a) Intra-Scan-Korrelation und Inter-Scan-Korrelation, als auch (b) Vergleich der Leukozytenzahlen des Routinelabors mit den Mittelwerten der zwei Scans.....	35
Abbildung 13 Vom LSC analysierte Zellen, mit der WinCyte Software Version 3.7 separiert in obere und untere Kammer. Aufgetragen in ein Diagramm Area vs. Draq5-red Integral, welches zur Einzelzellseparierung genutzt wurde (Abbildung 7).....	44
Abbildung 14 Schematische Rekonstruktion der Scan-Area der oberen Kammer aus den einzelnen Scan-Bildern zur Verdeutlichung der Software-Spezifischen Probleme: Erkannte und zu analysierende Zellen werden von der WinCyte Software Version 3.7 kontouriert....	47
Abbildung 15 Zwei schematische Scan-Bilder nebeneinander gelegt; Vergrößerung aus Abbildung 14 mit kontourierten und nicht kontourierten Zellen.....	48
Abbildung 16 Triggern mit Draq5 <sup>TM</sup> nach Anregung durch einen Laser; Darstellung der Draq5 <sup>TM</sup> -Lichtintensität in Abhängigkeit von der Bindung an dsDNA, mit Angabe exemplarischer Threshold-Konfigurationen.....	56
Abbildung 17 Regressionsgerade - Leukos O1-U1.....	64
Abbildung 18 Regressionsgerade - Leukos O2-U2.....	64
Abbildung 19 Regressionsgerade – Leukos MW1-MW2.....	64
Abbildung 20 Regressionsgerade - Leukos MW1-RL.....	64
Abbildung 21 Regressionsgerade - Leukos MW2-RL.....	65
Abbildung 22 Regressionsgerade - CD3 O1-U1.....	65
Abbildung 23 Regressionsgerade - CD3 O2-U2.....	65
Abbildung 24 Regressionsgerade - CD3 MW1-MW2.....	65
Abbildung 25 Regressionsgerade - CD4 O1-U1.....	65
Abbildung 26 Regressionsgerade - CD4 O2-U2.....	65
Abbildung 27 Regressionsgerade - CD4 MW1-MW2.....	66
Abbildung 28 Regressionsgerade - CD8 O1-U1.....	66

Abbildung 29 Regressionsgerade - CD8 O2-U2.....	66
Abbildung 30 Regressionsgerade - CD8 MW1-MW2.....	66
Abbildung 31 Bland-Altman-Diagramm - Leukos O1-U1 .....	66
Abbildung 32 Bland-Altman-Diagramm - Leukos O2-U2 .....	66
Abbildung 33 Bland-Altman-Diagramm - Leukos MW1-MW2 .....	67
Abbildung 34 Bland-Altman-Diagramm - Leukos MW1-RL .....	67
Abbildung 35 Bland-Altman-Diagramm - Leukos MW2-RL .....	67
Abbildung 36 Bland-Altman-Diagramm - CD3 O1-U1 .....	67
Abbildung 37 Bland-Altman-Diagramm - CD3 O2-U2 .....	67
Abbildung 38 Bland-Altman-Diagramm - CD3 MW1-MW2 .....	67
Abbildung 39 Bland-Altman-Diagramm - CD4 O1-U1 .....	68
Abbildung 40 Bland-Altman-Diagramm - CD4 O2-U2 .....	68
Abbildung 41 Bland-Altman-Diagramm - CD4 MW1-MW2 .....	68
Abbildung 42 Bland-Altman-Diagramm - CD8 O1-U1 .....	68
Abbildung 43 Bland-Altman-Diagramm - CD8 O2-U2 .....	68
Abbildung 44 Bland-Altman-Diagramm - CD8 MW1-MW2 .....	68



## **9) LITERATURVERZEICHNIS**

- 1) Akbari O, Faul JL, Hoyte EG, Berry GJ, Wahlstrom J, Kronenberg M, DeKruyff RH, Umetsu DT. CD4<sup>+</sup> invariant T-cell-receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma. *N Engl J Med* 2006; 354: 1117-1129
- 2) Alamo AL, Melnick SJ. Clinical application of four and five-color flow cytometry lymphocyte subset immunophenotyping. *Cytometry* 2000; 42: 363-370
- 3) Arastéh K, Gözl J, Marcus U, Rockstroh J, Salzberger B, Vielhaber B, 2006: Antiretrovirale Therapie der HIV-Infektion. <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/055-001.htm> (12.10.2006)
- 4) Arastéh K, Gözl J, Marcus U, Rockstroh J, Salzberger B, Vielhaber B, 2005: Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion (Teilaktualisierung, Stand: Juni 2005). [http://www.rki.de/cln\\_048/nn\\_196070/DE/Content/InfAZ/H/HIVAIDS/Therapie/Leitlinien/D\\_\\_A\\_\\_antiretroviral\\_\\_06\\_\\_05.html](http://www.rki.de/cln_048/nn_196070/DE/Content/InfAZ/H/HIVAIDS/Therapie/Leitlinien/D__A__antiretroviral__06__05.html) (19.09.2007)
- 5) Bedner E, Halicka HD, Cheng W, Salomon T, Deptala A, Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. High affinity binding of fluorescein isothiocyanate to eosinophils detected by laser scanning cytometry: a potential source of error in analysis of blood samples utilizing fluorescein-conjugated reagents in flow cytometry. *Cytometry* 1999; 36: 77-82
- 6) Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res* 1999; 8: 135-160
- 7) Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 1: 307-310
- 8) Bocsi J, Varga VS, Molnar B, Sipos F, Tulassay Z, Tarnok A. Scanning fluorescent microscopy analysis is applicable for absolute and relative cell frequency determinations. *Cytometry A* 2004; 61: 1-8
- 9) Braun M, Immunsystem. In: Vogt HR-P, Garbsen SK, Braun J, HRSG. *Basislehrbuch Innere Medizin*. München, Jena: Urban & Fischer, 2004, 3. Auflage: 342-409

- 10) Carroll MC, Ward ES, Ravetch J, Kelsoe G, Fearon D. The humoral immune response. In: Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M, HRSG. Immunobiology 5. New York: Garland Publishing, 2001: 441-471
- 11) Cassens U, Gohde W, Kuling G, Groning A, Schlenke P, Lehman LG, Traore Y, Servais J, Henin Y, Reichelt D, Greve B. Simplified volumetric flow cytometry allows feasible and accurate determination of CD4 T lymphocytes in immunodeficient patients worldwide. *Antivir Ther* 2004; 9: 395-405
- 12) Cassens U, Gohde W, Kuling G, Groning A, Schlenke P, Lehman LG, Traore Y, Servais J, Henin Y, Reichelt D, Greve B. Simplified volumetric flow cytometry allows feasible and accurate determination of CD4 T lymphocytes in immunodeficient patients worldwide. *Antivir Ther* 2004; 9: 395-405
- 13) Centers for Disease Control, 1993: Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for aids among adolescents and adults. <http://hiv.net/link.pho?id=184> (19.09.2007)
- 14) Chapman GV. Instrumentation for flow cytometry. *J Immunol Methods* 2000; 243: 3-12.
- 15) Chen RY, Westfall AO, Hardin JM, Miller-Hardwick C, Stringer JS, Raper JL, Vermund SH, Gotuzzo E, Allison J, Saag MS. Complete Blood Cell Count as a Surrogate CD4 Cell Marker for HIV Monitoring in Resource-Limited Settings. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 44: 525-530
- 16) Chene G, Sterne JA, May M, Costagliola D, Ledergerber B, Phillips AN, Dabis F, Lundgren J, D'Arminio Monforte A, de Wolf F, Hogg R, Reiss P, Justice A, Leport C, Staszewski S, Gill J, Fatkenheuer G, Egger ME. Prognostic importance of initial response in HIV-1 infected patients starting potent antiretroviral therapy: analysis of prospective studies. *Lancet* 2003; 362: 679-686
- 17) Cheng X, Irimia D, Dixon M, Ziperstein JC, Demirci U, Zamir L, Tompkins RG, Toner M, Rodriguez WR. A Microchip Approach for Practical Label-Free CD4<sup>+</sup>T-Cell Counting of HIV-Infected Subjects in Resource-Poor Settings. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 45: 257-261
- 18) Chin CD, Linder V, Sia SK. Lab-on-a-chip devices for global health: Past studies and future opportunities. *Lab Chip* 2007; 7: 41-57

- 19) Cho Y, Miyamoto M, Kato K, Fukunaga A, Shichinohe T, Kawarada Y, Hida Y, Oshikiri T, Kurokawa T, Suzuoki M, Nakakubo Y, Hiraoka K, Murakami S, Shinohara T, Itoh T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 1555-1559
- 20) Clatch RJ, Foreman JR, Walloch JL. Simplified immunophenotypic analysis by laser scanning cytometry. *Cytometry* 1998; 34: 3-16
- 21) Clatch RJ, Foreman JR. Five-color immunophenotyping plus DNA content analysis by laser scanning cytometry. *Cytometry* 1998; 34: 36-38
- 22) Clatch RJ, Walloch JL, Zutter MM, Kamensky LA. Immunophenotypic analysis of hematologic malignancy by laser scanning cytometry. *Am J Clin Pathol* 1996; 105: 744-755
- 23) Clatch RJ, Walloch JL. Multiparameter immunophenotypic analysis of fine needle aspiration biopsies and other hematologic specimens by laser scanning cytometry. *Acta Cytol* 1997; 41: 109-122
- 24) Daniel V. Monitoring von HIV-Patienten. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G, HRSG. *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel: Karger, 2007, 1. Auflage: 741-758
- 25) Dieye TN, Vereecken C, Diallo AA, Ondoa P, Diaw PA, Camara M, Karam F, Mboup S, Kestens L. Absolute CD4 T-cell counting in resource-poor settings: direct volumetric measurements versus bead-based clinical flow cytometry instruments. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 39: 32-37
- 26) Dörner K, Deufel T, Dörner R. *Allgemeine Klinische Chemie*. In: Dörner K, HRSG. *Klinische Chemie und Hämatologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2003, 5. Auflage: 1-85
- 27) Eberle C. Ein Plädoyer für kostengünstigere Labortechnologie in Entwicklungsländern. *Tribüne-Schweizerische Ärztezeitung* 2006; 35: 1505-1507
- 28) Freihorts, 1998: Allergische Alveolitis, interstitielle Fibrose. <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/026-013.htm> (12.10.2006)
- 29) Garbe C, 2005: Kutane Lymphome. <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/032-027.htm> (12.10.2006)

- 30) Germing U, Hagenström H, Hönig W. Leukämien. In: Herold G, HRSG. Innere Medizin. Köln, 2005: 74-80
- 31) Gerstner AO, Lenz D, Laffers W, Hoffman RA, Steinbrecher M, Bootz F, Tarnok A. Near-infrared dyes for six-color immunophenotyping by laser scanning cytometry. *Cytometry* 2002; 48: 115-123
- 32) Gerstner AO, Tarnok A. Clinical applications of laser scanning cytometry. *Cytometry* 2002; 50: 133-143
- 33) Gerstner AO, Trumpfheller C, Racz P, Osmancik P, Tenner-Racz K, Tarnok A. Quantitative histology by multicolor slide-based cytometry. *Cytometry A* 2004; 59: 210-219. Erratum in: *Cytometry A* 2004; 61A: 196. Corrected and republished in: *Cytometry A* 2004; 61: 210-219
- 34) Gerstner AOH, Lenz D, Bocsi J. Technische und methodische Grundlagen der Objektträger-basierten Zytometrie. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G, HRSG. Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Basel: Karger, 2007, 1. Auflage: 71-82
- 35) Griveas I, Dorothea P, Alexandra F, George V, Pavlitou A, Sakellariou G. Comparison of blood and peritoneal lymphocytes from continuous ambulatory peritoneal dialysis patients, asymptomatic and with peritonitis. *Ren Fail* 2006; 28: 237-239
- 36) Gruber R. Charakterisierung der T-Lymphozyten. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G, HRSG. Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Basel: Karger, 2007, 1. Auflage: 258-281
- 37) Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 1982; 143: 29-36
- 38) Hennerbichler S, Kroisel PM, Zierler H, Pertl B, Wintersteiger R, Dohr G, Sedlmayr P. Fetal nucleated red blood cells in peripheral blood of pregnant women: detection and determination of location on a slide using laser-scanning cytometry. *Prenat Diagn* 2003; 23: 710-715
- 39) Hilwig I, Gropp A. Dekondensation von konstitutivem Heterochromatin mit H33258. *Exp Cell Res* 1973; 81: 474-477

- 40) HIV Surrogate Marker Collaborative Group. Human immunodeficiency virus type 1 RNA level and CD4 count as prognostic markers and surrogate end points: a meta-analysis. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16: 1123-1133
- 41) Kabelitz D, Wesch D. T-Zell-Rezeptor Repertoire. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G, HRSG. *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel: Karger, 2007, 1. Auflage: 282-293
- 42) Kamensky LA, Burger DE, Gershman RJ, Kamensky LD, Luther E. Slide-based laser scanning cytometry. *Acta Cytol* 1997; 41: 123-43
- 43) Kamensky LA, Kamensky LD. Microscope-based multiparameter laser scanning cytometer yielding data comparable to flow cytometry data. *Cytometry* 1991; 12: 381-387
- 44) Kapuscinski J, Szer W. Interaktion von DAPI mit synthetischen Polynukleotiden. *Nucleic Acids Res* 1979; 6: 3519-3534
- 45) Kausch H, Lozán JL. *Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler*. Hamburg: Wissenschaftliche Auswertungen 2004; 3. Auflage
- 46) Keller T. Statistische Aspekte bei der Multiparameteranalyse. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G, HRSG. *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel: Karger, 2007, 1. Auflage: 208-236
- 47) Kitchen CM, Kitchen SG, Dubin JA, Gottlieb MS. Initial virological and immunologic response to highly active antiretroviral therapy predicts long-term clinical outcome. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 466-472
- 48) Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-497
- 49) Kuckuck FW, Edwards BS, Sklar LA. High throughput flow cytometry. *Cytometry* 2001; 44: 83-90
- 50) Kurowski R. Infektionskrankheiten. In: Vogt HR-P, Garbsen SK, Braun J, HRSG. *Basislehrbuch Innere Medizin*. München, Jena: Urban & Fischer, 2004, 3. Auflage: 1058-1161

- 51) Labarca C, Paigen K. Einfacher, schneller und sensitiver DNA-Nachweis mit H33258. *Anal. Biochem* 1980; 102: 344-352
- 52) Laffers W, Mittag A, Lenz D, Tarnok A, Gerstner AO. Iterative restaining as a pivotal tool for n-color immunophenotyping by slide-based cytometry. *Cytometry A* 2006; 69: 127-130
- 53) Laffers W. Untersuchungen zum Phänotyp peripherer Blutleukozyten bei Patienten mit Kopf-Hals-Malignomen. Dissertationsarbeit an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig. Leipzig: 2004
- 54) Liu XP, Sato T, Oga A, Ikemoto K, Kawauchi S, Ikeda E, Sasaki K. Two subtypes of mucinous colorectal carcinoma characterized by laser scanning cytometry and comparative genomic hybridization. *Int J Oncol* 2004; 25: 615-621
- 55) Loborg H, Linden E, Lonn A, Skoglund P, Rundquist I. High affinity binding of 7-aminoactinomycin D and 4',6-diamidino-2-phenylindole to human neutrophilic granulocytes and lymphocytes. *Cytometry* 1995; 20: 296-306
- 56) Lun A, Sack U, Monitoring organtransplantierter Patienten. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G, HRSG. *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel: Karger, 2007, 1. Auflage: 759-784
- 57) Lynen L, Teav S, Vereecken C, De Munter P, An S, Jacques G, Kestens L. Validation of primary CD4 gating as an affordable strategy for absolute CD4 counting in Cambodia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 43: 179-185
- 58) Schrappe M, Creutzig U, 2005: Akute lymphoblastische (ALL) und akute myeloische (AML) Leukämie im Kindesalter. <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/025-014.htm> (12.10.2006)
- 59) Macey M. Leukocyte immunobiology. In: McCarthy D, Macey M, HRSG. *Cytometric Analysis of Cell Phenotype and Function*. Cambridge: Cambridge University Press, 2001: 118-137
- 60) Manasa J, Musabaike H, Masimirembwa C, Burke E, Luthy R, Mudzori J. Evaluation of the Partec flow cytometer against the BD FACSCalibur system for monitoring immune responses of human immunodeficiency virus-infected patients in Zimbabwe. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 293-298

- 61) Manasa J, Musabaike H, Masimirembwa C, Burke E, Luthy R, Mudzori J. Evaluation of the Partec flow cytometer against the BD FACSCalibur system for monitoring immune responses of human immunodeficiency virus-infected patients in Zimbabwe. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 293-298
- 62) Martin RM, Leonhardt H, Cardoso MC. DNA labeling in living cells. *Cytometry A* 2005; 67: 45-52
- 63) Mason D, Andre P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, de Haas M, Goyert S, Hadam M, Hart D, Horejsi V, Meuer S, Morrissey J, Schwartz-Albiez R, Shaw S, Simmons D, Uguccioni M, van der Schoot E, Vivier E, Zola H. CD Antigens 2002. *J Immunol* 2002; 168: 2083-2086
- 64) Mason DY, Andre P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, de Haas M, Goyert S, Hadam M, Hart D, Horejsi V, Meuer S, Morrissey J, Schwartz-Albiez R, Shaw S, Simmons D, Uguccioni M, van der Schoot E, Vivier E, Zola H. CD antigens 2001. *Tissue Antigens* 2001; 58: 425-430
- 65) McCoy J. Handling, storage and preparation of human blood cells. In: Robinson J, HRSG. *Current Protocols in Cytometry*. Edison: Wiley and Sons, 1998, Unit 5: 1
- 66) Mellors JW, Rinaldo CR Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996; 272: 1167-1170. Erratum in: *Science* 1997; 275: 14
- 67) Mittag A, Lenz D, Gerstner AO, Tarnok A. Hyperchromatic cytometry principles for cytomics using slide based cytometry. *Cytometry A* 2006; 69: 691-703
- 68) Mosch B, Mittag A, Lenz D, Arendt T, Tarnok A. Laser scanning cytometry in human brain slices. *Cytometry A* 2006; 69: 135-138
- 69) Nouanthong P, Pata S, Sirisanthana T, Kasinrerak W. A simple manual rosetting method for absolute CD4<sup>+</sup> lymphocyte counting in resource-limited countries. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 598-601
- 70) Pejcić T, Stanković I, Rancić M, Ristić L. Bronchoalveolar lavage and pulmonary sarcoidosis *Med pregl* 2005; 58: 11-15

- 71) Penketh PG, Shyam K, Sartorelli AC. Fluorometric assay for the determination of DNA-DNA cross-links utilizing Hoechst 33258 at neutral pH values. *Anal Biochem* 1997; 252: 210-213
- 72) Pozarowski P, Huang X, Gong RW, Priebe W, Darzynkiewicz Z. Simple, semiautomatic assay of cytostatic and cytotoxic effects of antitumor drugs by laser scanning cytometry: effects of the bis-intercalator WP631 on growth and cell cycle of T-24 cells. *Cytometry A* 2004; 57: 113-119
- 73) Bender R, Lange St. Was ist der p-Wert?. *Dtsch Med Wschr* 2001; 126: T39-40
- 74) Roederer M, Parks DR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Flow Cytometry. In: Delves PJ, Roitt IM, HRSG. *Encyclopedia of Immunology*. London: Academic Press, 1998; 2nd edition: 932-943
- 75) Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E, Kosma VM. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J. Pathol* 1997; 182: 318-324
- 76) Ruzicka K, Veitl M, Thalhammer-Scherrer R, Schwarzinger I. The new hematology analyzer Sysmex XE-2100: performance evaluation of a novel white blood cell differential technology. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125: 391-396
- 77) Sack U, Rothe G, Barlage S, Gruber R, Kabelitz D, Kleine T, Lun A, Renz H, Ruf A, Schmitz G. Durchflusszytometrie in der Klinischen Diagnostik. *J Lab Med* 2000; 24: 277-297
- 78) Schiemann M, Busch DH. Auswahl und Kombination von Fluoreszenzfarbstoffen. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G, HRSG. *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel: Karger, 2007, 1. Auflage: 83-119
- 79) Shapiro HM, Perlmutter NG. Personal cytometers: slow flow or no flow?. *Cytometry A* 2006; 69: 620-630
- 80) Sia SK, Linder V, Parviz BA, Siegel A, Whitesides GM. An integrated approach to a portable and low-cost immunoassay for resource-poor settings. *Angew Chem Int Ed Engl* 2004; 43: 498-502
- 81) Smith PJ, Blunt N, Wiltshire M, Hoy T, Teesdale-Spittle P, Craven MR, Watson JV, Amos WB, Errington RJ, Patterson LH. Characteristics of a novel deep red/infrared fluorescent cell-permeant DNA probe, DRAQ5, in intact human cells analyzed by flow cytometry, confocal and multiphoton microscopy. *Cytometry* 2000; 40: 280-291



- 82) Smith PJ, Wiltshire M, Davies S, Patterson LH, Hoy T. A novel cell permeant and far red-fluorescing DNA probe, DRAQ5, for blood cell discrimination by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1999; 229: 131-139
- 83) Sterling TR, Chaisson RE, Moore RD. HIV-1 RNA, CD4 T-lymphocytes, and clinical response to highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2001; 15: 2251-2257
- 84) Stokke T, Steen HB. Distinction of leucocyte classes based on chromatin-structure-dependent DNA-binding of 7-aminoactinomycin D. *Cytometry* 1987; 8: 576-83
- 85) Stokke T, Steen HB. Vielfache Bindungsweisen von H33258 an DNA, *J Histochem Cytochem* 1985; 33: 333-338
- 86) Tarnok A, Gerstner AO. Clinical applications of laser scanning cytometry. *Cytometry* 2002; 50: 133-43
- 87) Tarnok A. New technologies for the human cytome project. *J Biol Regul Homeost Agents* 2004; 18: 92-95
- 88) Tárnok A, Lenz D, Mittag A. Qualitätskontrolle und Standardisierung. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G, HRSG. *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*; Basel: Karger, 2007, 1. Auflage: 157-177
- 89) Tudos AJ, Besselink GJ, Schasfoort RB. Trends in miniaturized total analysis systems for point-of-care testing in clinical chemistry. *Lab Chip* 2001; 1: 83-95
- 90) Virchow R. *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*, Berlin: Verlag von August Hirschwald, 1858
- 91) Wahn U, Seger R, Wahn V. *Pädiatrische Allergologie und Immunologie*. München, Jena: Urban & Fischer, 2005, 2. Auflage
- 92) Walters J, Garrity P. Performance Evaluation of the Sysmex XE-2100 Hematology Analyzer. *Laboratory Hematology* 2000; 6: 83-92
- 93) Waring M. Ethidium and Propidium. In: Corcoran JW, Hahn FE, HRSG. *Antibiotics*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1975, 3. Auflage: 141-165

- 94) Watson CJ, Cobbold SP, Davies HF, Rebello PR, Waldmann H, Calne RY, Metcalfe SM. CD4 and CD8 monoclonal antibody therapy in canine renal allografts. *Transpl Int* 1994; 7: 322-324
- 95) Watson CJ, Davies HF, Cobbold SP, Rasmussen A, Rebello PR, Thiru S, Waldmann H, Calne RY, Metcalfe SM. CD4 and CD8 monoclonal antibody therapy in the dog: strategies to induce tolerance to renal allografts. *Transplant Proc* 1995; 27: 123-124
- 96) Wilson WD, Tanious FA, Barton HJ, Jones RL, Streckowski L, Boykin DW. Binding of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to GC and mixed sequences in DNA: intercalation of a classical groove-binding molecule. *J Am Chem Soc* 1989; 111: 5008-5010
- 97) Wurzinger LJ, Blut. In: Grazi M, HRSG. *Histologie*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 2002, 5. Auflage: 189-210
- 98) Yuan CM, Douglas-Nikitin VK, Ahrens KP, Luchetta GR, Braylan RC, Yang L. DRAQ5-based DNA content analysis of hematolymphoid cell subpopulations discriminated by surface antigens and light scatter properties. *Cytometry B Clin Cytom* 2004; 58: 47-52
- 99) Zijenah LS, Kadzirange G, Madzime S, Borok M, Mudiwa C, Tobaiwa O, Muccheche M, Rusakaniko S, Katzenstein DA. Affordable flow cytometry for enumeration of absolute CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes to identify subtype C HIV-1 infected adults requiring antiretroviral therapy (ART) and monitoring response to ART in a resource-limited setting. *J Transl Med* 2006; 14: 4-33