Aus dem Institut für Transfusionsmedizin

der Medizinischen Fakultät Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

# Vergleich von konstanter und periodischer Trenngrenze bei der Thrombozytapherese mit dem Blutzellseparator Fresenius AS 104

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité

Der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Bettina Balke

aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. J. W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dr. H. Kiesewetter

2. Prof. Dr. P. Hellstern

3. Prof. Dr. G. Zietz

eingereicht: 10.04.2002

Datum der Promotion: 28.10.2002

# Inhaltsverzeichnis


| | | |
|---|---|---|
| I. | Einleitung | 6 |
| 1. | Allgemeine Einleitung | 7 |
| 2. | Herleitung einer Aufgabenstellung | 12 |
| II. | Material und Methoden | 13 |
| 1. | Charakterisierung der Probanden | 14 |
| 2. | Charakterisierung der Thrombozytaphereseverfahren | 15 |
| 2.1. | Grundprinzipien und Aufbau der zweistufigen Thrombozyten-separationskammer des Blutzellseparators Fresenius AS 104 | 15 |
| 2.2. | Die Trenngrenzenposition | 17 |
| 2.2.1. | Konstante und periodische Trenngrenzenposition | 17 |
| 2.3. | Durchführung der Thrombozytapherese | 18 |
| 3. | Probengewinnung | 19 |
| 3.1 | Gewinnung von Spenderblut vor der Thrombozytapherese | 19 |
| 3.2. | Gewinnung von Spenderblut nach der Thrombozytapherese | 19 |
| 3.3. | Gewinnung von Thrombozytenkonzentrat nach der Thrombozytapherese | 19 |
| 4. | Meßmethoden | 20 |
| 4.1. | Durchflußzytometer FACScan | 20 |
| 4.1.1. | Präparation des Thrombozytapheresekonzentrats vor der durchfluß-zytometrischen Messung | 22 |
| 4.1.2. | Messung und Datenerfassung am Durchflußzytometer | 23 |
| 4.2. | Blutbildautomat Abbott Cell-Dyn 3500 | 25 |
| 4.2.1. | Präparation des Thrombozytapheresekonzentrates vor der Messung | 26 |
| 4.3. | Nageotte-Zählkammer | 26 |
| 4.3.1. | Präparation des Thrombozytapheresekonzentrates vor der Zählung in der Nageotte-Kammer | 27 |
| 4.3.2. | Auszählung der Leukozyten in der Nageotte-Zählkammer; Berechnung | 27 |

| | | |
|---|---|---|
| 5. | Auswertung | 28 |
| 5.1. | Parameterermittlung und Berechnungen | 28 |
| 6. | Statistik | 29 |
| III. | Ergebnisse | 31 |
| 1. | Einteilung der Messergebnisse | 32 |
| 1.1. | Ausgangswerte | 32 |
| 1.2. | Thrombozytaphereseparameter | 33 |
| 1.3. | Effektivitätsparameter | 33 |
| 1.3.1. | Thrombozytenausbeute | 35 |
| 1.3.2. | Separationsleistung und Separationseffizienz | 36 |
| 1.3.3. | Leukozytenkontamination | 37 |
| 2. | Korrelation der drei Meßmethoden modifizierte Nageotte-Zählkammer, FACScan und Blutbildautomat Abbott CD 3500 bezüglich der Leukozytenkonzentrationen in den Thrombozytenkonzentraten | 40 |
| 2.1. | Korrelation zwischen Nageotte-Zählkammer und Blutbildautomat Abbott CD 3500 | 40 |
| 2.2. | Korrelation zwischen Nageotte-Zählkammer und FACScan | 41 |
| IV. | Diskussion | 43 |
| 1. | Methodenvergleich Leukozytenzählung | 44 |
| 2. | Vergleich der Apherese-Methode | 50 |
| V. | Zusammenfassung | 59 |
| VI. | Literaturverzeichnis | 63 |
| VII. | Danksagung | 72 |
| VIII. | Eidesstattliche Erklärung | 74 |

# Kapitel I

# Einleitung

# 1. ALLGEMEINE EINLEITUNG

1910 berichtete DUKE [19] erstmalig über den blutstillenden Effekt von Bluttransfusionen bei Blutungsleiden, die thrombozytopenisch bedingt waren. Seine frühen Beobachtungen bildeten die Basis für den therapeutischen Einsatz von Thrombozytenkonzentraten.

In den 50er Jahren wurde die Wirksamkeit von Thrombozytentransfusionen an bestrahlten thrombozytopenischen Tieren experimentell gezeigt [18]. Das konnte wenig später bei Patienten mit plättchenbedingten Blutungsleiden bestätigt werden [27, 75].

Ab 1960 standen Thrombozytenhochkonzentrate für thrombozytopenische Patienten zur Verfügung [37].

Seitdem hat die Transfusion von Thrombozyten ständig an Bedeutung zugenommen und ist heute - neben der Transfusion von Erythrozyten - die wichtigste transfusionsmedizinische Maßnahme.

Vor allem die moderne internistisch-onkologische Therapie ist durch den Einsatz von Thrombozytenkonzentraten überhaupt erst möglich geworden.

Dementsprechend ist der Bedarf an Plättchenkonzentraten sprunghaft gestiegen.

Die Herstellung von Thrombozytenkonzentraten aus Vollblut kann grundsätzlich aus plättchenreichem Plasma (PRP-Methode) oder aus buffy coat (BC-Methode) erfolgen. Bei der PRP-Methode [51] wird Blut von randomisierten Spendern bei niedriger Umdrehungszahl zentrifugiert, um plättchenreiches Plasma herzustellen. Dieses wird dann bei hoher Umdrehungszahl zentrifugiert, um die Plättchen zu sedimentieren. Nach einer Ruhephase werden die Plättchen in 50 ml Spenderplasma aufgenommen.

Bei der BC-Methode [51] wird das Blut von randomisierten Spendern bei hoher Umdrehungszahl zentrifugiert, wobei ein zellfreier Plasmaüberstand über den sedimentierten Erythrozyten und dem dazwischenliegenden buffy coat verbleibt. Der buffy coat kann gewonnen werden und wird danach für die Präparation des Thrombozytenkonzentrates einer zweiten, langsamen Zentrifugation unterworfen. Der Nachteil der BC-Methode liegt in einer niedrigeren Plättchenausbeute, die Vorteile in einer höheren Plasmaausbeute sowie einer niedrigeren Erythrozyten- und Leukozyten-kontamination [51].

Die selektive Gewinnung größerer Mengen an Thrombozyten wurde in den 70er Jahren mit der Einführung von Zellseparatoren möglich, wobei zunächst mit manuellen Verfahren gearbeitet wurde.

Heute stehen für die Thrombozytapherese Zellseparatoren zur Verfügung, die mit einem kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Separationsverfahren arbeiten.

Beide Trenntechniken basieren auf der Separation von Blutkomponenten nach Größe und Dichte. Der Spender ist dabei direkt mit der laufenden Zentrifuge verbunden [38].

Zellseparatoren mit diskontinuierlichem Wirkprinzip entnehmen und verarbeiten kleine Mengen Blut und retransfundieren die nicht benötigten zellulären Elemente, bevor eine neue Menge Blut entnommen und separiert wird [38].

Kontinuierlich arbeitende Zellseparatoren extrahieren die zellulären Elemente aus dem ununterbrochen durchfließenden Blut [55]. Die nicht benötigten Zellkomponenten werden bereits während der Extraktion fortlaufend an den Spender zurückgegeben.

Thrombozytenkonzentrate, die in der automatischen Thrombozytapherese gewonnen werden, sind Einzelspender-Konzentrate.

Nach den "Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“ [2] muß das Thrombozytapheresekonzentrat wie auch das leukozytendepletierte Thrombozytapheresekonzentrat mindestens $2 \times 10^{11}$ Thrombozyten pro Transfusionseinheit enthalten. Demgegenüber besitzt ein Thrombozytenkonzentrat aus einer Vollblutkonserve lediglich $0{,}5 \times 10^{11}$ Thrombozyten pro Transfusionseinheit.

Vier bis acht Thrombozytenkonzentrate aus Vollblut sind also erforderlich, um den therapeutischen Effekt von einem Thrombozytapheresekonzentrat zu erzielen.

KRETSCHMER [34] faßte in einer Arbeit von 1996 die in Europa geübte Praxis der Thrombozytentransfusionen dahingehend zusammen, daß der überwiegende Teil der transfusionsmedizinischen Zentren randomisierte, gepoolte Plättchenkonzentrate bereitstellt. Apheresekonzentrate, die teurer sind, werden mehrheitlich für chronisch thrombozytopenische Patienten verwendet. Human leucocyte antigen (HLA)- kompatible Plättchen werden vor allem für immunisierte oder therapierefraktäre Patienten eingesetzt.

Alle Thrombozytenkonzentrate, ob durch Vollblutkonserven oder mittels Thrombozytapherese am Zellseparator gewonnen, enthalten unterschiedlich große Mengen an kontaminierenden Leukozyten, die im Empfänger für negative immunologische wie infektiöse Folgen verantwortlich sein können.

Da Thrombozytenkonzentrate ein fester Bestandteil der modernen Medizin geworden sind, haben sich in den letzten Jahren viele Arbeitsgruppen mit den durch kontaminierende Spenderleukozyten verursachten Risiken von Thrombozytentransfusionen beschäftigt.

Von besonderer Bedeutung ist hier die Alloimmunisierung. Sie entsteht durch Bildung von Antikörpern des Empfängers gegen Antigene des Spenders, vor allem des HLA-Systems.

HLA-Antigene werden vom Haupthistokompatibilitätskomplex (major histo-compatibility-complex, MHC) kodiert. Sie sind unterteilt in Klasse-I-Antigene , die auf allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten nachzuweisen sind, und in Klasse-II-Antigene , die nur von Antigen-präsentierenden Zellen (Monozyten, B-Lymphozyten, aktivierte T-Lymphozyten) exprimiert werden.

Für die Entstehung einer Alloimmunisierung müssen sowohl Klasse-I-Antigene und Klasse-II-Antigene auf einer Zelle vorhanden sein, was nur bei bestimmten Leukozyten der Fall ist. Thrombozyten allein sind nur schwach immunogen, weil sie Klasse-I-, jedoch nicht Klasse-II-HLA-AG exprimieren. Das Thrombozytenkonzentrat, das kontaminierende, gleichzeitig Klasse I- und Klasse II-HLA-AG tragende Spenderleukozyten enthält, kann im Empfänger eine Allo-Antikörperbildung gegen HLA-Klasse I-AG auf Spenderplättchen auslösen.

Eine besonders gravierende klinische Folge der Alloimmunisierung ist die Thrombozyten-refraktärität. Durch Plättchenrefraktärität des Empfängers wächst das Risiko thrombozytopenisch bedingter, schwer therapierbarer Blutungen. Die Alloimmunisierungs- und Refraktäritätsrate von chronisch transfundierten Patienten wird in der Literatur mit 17 – 100% angegeben [10,15,21, 36,52,60, 70, 72].

Eine weitere immunologisch bedingte Folge nach Transfusion von Thrombozytenkonzentraten können febrile nichthämolytische Transfusionsreaktionen (FNHTR) sein, mit deren Auftreten in über 1% der Fälle zu rechnen ist [41].

Bei einer Körpertemperaturerhöhung um mindestens 1 Grad, mit oder ohne Schüttelfrost und in zeitlicher Verbindung zu einer Transfusion, wird von einer FNHTR gesprochen. Der Zusammen-hang zwischen FNHTR und Spenderleukozyten ist seit mehr als 30 Jahren bekannt [11, 61].

Neueste Forschungsergebnisse bezüglich der Ursache von FNHTR zeigen, daß während der Lagerung der Thrombozytenkonzentrate aus den kontaminierenden Leukozyten Zytokine freigesetzt werden und akkumulieren. MYELLE et al. [53] haben festgestellt, daß FNHTR mit der Höhe der Konzentration dieser Zytokine korrelieren.

Aber auch HLA-Antikörper [16, 17], die von BRUBAKER [12] untersuchten Granulozyten-Antikörper und Plättchen-Antigene [9] scheinen an der Auslösung der FNHTR beteiligt zu sein.

Weiterhin kann die Transfusion von kontaminierenden Leukozyten in Thrombozytenkonzentraten eine Immunsuppression beim Empfänger verursachen. Erstmalig beschrieben OPELZ et al. [57] den immunsuppressiven Effekt von allogenen Bluttransfusionen. Sie beobachteten, daß präoperative Transfusionen eine positive Wirkung auf die Überlebensrate eines Nierentransplantats haben. Eine weitere günstige Folge der Immunsuppression ist eine erniedrigte Rezidivrate von entzündlichen Darmerkrankungen nach allogenen Transfusionen [62, 88].

Ferner wurde in retrospektiven Studien dieser immunsuppressive Effekt sowohl für eine höhere perioperative Infektionsrate als auch für ein erhöhtes Rezidivrisiko nach Vollblut-transfusionen bei Karzinompatienten verantwortlich gemacht [23, 26, 14].

Die genauen Mechanismen der Immunsuppression beim Empfänger durch allogene Transfusionen bleiben weiterhin aufzuklären. Bereits bekannt ist, das Spenderleukozyten, die HLA-Klasse-II-Antigene tragen, zur Down-Regulation des Immunsystems (Abnahme der Antigenrepräsentation, verringerte Killerzellaktivität etc.) führen können [6].

Ein ernstes Risiko für den Empfänger stellt die Virustransmission durch Transfusion von Spenderleukozyten dar. Die Gefahr postransfusioneller viraler Infektionen durch intrazellulär persistierende Viren (CMV, EBV) können durch eine Leukozytenreduktion vermindert werden [7].

Das ist vor allem für die klinisch relevante CMV-Infektion von Belang, die bei Immunsupprimierten dramatisch verlaufen kann [7]. Zwei Studien an Patienten nach Herztransplantationen zeigen, daß sich die Gefahr einer latenten CMV-Infektion reduzieren läßt, wenn kontaminierende Leukozyten aus den Thrombozytenkonzentraten entfernt werden [77, 8].

Bei HIV-infizierten Patienten konnte nachgewiesen werden, daß das Fortschreiten der Erkrankung nach Transfusionen beschleunigt war [71, 82, 85].

Alloantikörperbildung, Thrombozytenrefraktärität, FNHTR, die Übertragung und Reaktivierung viraler Infektionen und eine mögliche Immunsuppression können nach Transfusion kontaminierender Spenderleukozyten entscheidende klinische Bedeutung erlangen.
Die Kosten einer adäquaten Versorgung HLA-immunisierter und im besonderen refraktärer Patienten mit HLA-kompatiblen Thrombozytenpräparaten sind enorm hoch, und die Verfügbarkeit von passenden Spendern kann ein limitierender Faktor der Therapie sein. Klinische Studien konnten zeigen, daß bei einer Leukozytenkontamination der Blutpräparate von weniger als 1 bis 5 x $10^6$ Leukozyten pro Transfusionseinheit Alloimmunisierungen weitgehend vermieden werden [71, 42, 22].

Die Produktmonografie des BGA [3] von 1989 hat in Thrombozytenkonzentraten eine Leukozyten-Obergrenze von 5 x $10^8$ pro Transfusionseinheit festgelegt.
Die „critical immunologic load of leukocytes“ (cill), d.h. die kritische Schwelle der Anzahl kontaminierender Leukozyten für die Entstehung der Alloimmunisierung, liegt demgegenüber mit 1 x $10^6$ Leukozyten pro Transfusionseinheit erheblich niedriger [44].
Bei diesem cill-Wert handelt es sich um eine Risikoabschätzung, da die genaue Leukozytenzahl für eine Sensibilisierung im Einzelfall nicht bekannt ist und die jeweilige Sensibilisierungsbereitschaft des Empfängers beachtet werden muß.

In den letzten Jahren wurde belegt, daß durch die Entfernung der Leukozyten unter die kritische Grenze von 1 bis 5 x $10^6$ Leukozyten pro Transfusionseinheit die Alloimmunisierungsrate auf gegen Null reduziert werden kann [54, 67, 84].

SAARINEN et al. [67], sowie OKSANEN und ELONEN [56] beschreiben dabei eine Leukozytenreduktion unter 1 x $10^6$ Leukozyten pro Transfusionseinheit als klinisch erforderlich und therapeutisch höchst effizient.

Die neuen „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“ vom Jahr 2000 [2] tragen den aktuellen Studienergebnissen Rechnung. In leukozytendepletierten Thrombozytapheresekonzentraten muß demnach der Restleukozytengehalt unter 1 x $10^6$ pro Transfusionseinheit eingehalten werden.

Mit der Bekanntmachung des Paul Ehrlich Institutes vom 18.09.2000 [1] dürfen seit

01. Oktober 2001 ausschließlich Vollblute, Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrate in den Verkehr gebracht werden, deren Leukozytengehalt weniger als 1 x $10^6$ pro Transfusionseinheit beträgt.

Für die Unterschreitung des cill-Wertes werden in praxi 2 Wege der Leukozytendepletion, der Entfernung der weißen Blutzellen, gegangen:

Die Methode der Wahl bestand bisher im Einsatz von Leukozytenfiltern. Die Leukozytenreduktion beträgt dabei mehr als 3 log Stufen [40, 50]. Nachteile dieser Art der Leukozytendepletion sind zusätzliche Kosten und zeitlicher Aufwand sowie der Thrombozytenverlust.

Eine Alternative zur Leukozytendepletion mittels Filter ist die Modifikation des Zellseparators und damit der Thrombozytapherese.

Diese Möglichkeit hat den Vorteil, daß die Leukozytenzahl in den Präparaten bereits im Ansatz, während der Konzentratherstellung, gesenkt wird und auf den Einsatz von Leukozytenfiltern verzichtet werden kann.

Die vorliegenden Arbeit untersucht, ob mit einer Modifikation des Blutzellseparators FRESENIUS AS 104 die Leukozytenzahl im Thrombozytapheresekonzentrat regelmäßig unter den cill-Wert gesenkt werden kann.

## 2. HERLEITUNG EINER AUFGABENSTELLUNG

Die vorliegende Arbeit möchte einen Beitrag zur Thematik der Leukozytendepletion in Thrombozytapheresekonzentraten liefern. Die verwendeten Apherese-Verfahren und Meßmethoden dienen der Beantwortung folgender Fragen:

1. Resultiert aus der Modifikation der Trenngrenzenposition am Zellseparator FRESENIUS AS 104 eine geringere Leukozytenkonzentration und somit geringere Leukozytenkontamination in den Thrombozytapheresekonzentraten?
2. Läßt sich die Leukozytenkontamination in den Thrombozytapheresekonzentraten mit Hilfe der modifizierten Trenngrenzenposition regelmäßig unter den cill-Wert senken?
3. Ist es möglich, mit dem Blutbildautomat Abbott CD 3500 Leukozytenkontaminationen in den niedrigen Konzentrationen im Bereich des cill-Wertes zu messen?
4. Gibt es Unterschiede in den Messergebnissen zwischen der durchflußzytometrischen Messung am FACScan und dem „Gold-Standard“, der modifizierten Nageotte-Kammer bezüglich der Leukozytenkontaminationen in den Thrombozytapheresekonzentraten?

Um die Reinheit der Thrombozytapheresekonzentrate zu verbessern, wurde am Blutzellseparator FRESENIUS AS 104 die Trenngrenzenposition verändert.
Der konstanten Trenngrenzenposition wurde die Modifikation mit periodischer Trenngrenzenposition gegenübergestellt.

Für die Analyse der niedrigen Leukozytenkonzentrationen in den Thrombozytapherese-konzentraten wurden drei Meßmethoden verwendet:
Als „Gold-Standard“ die modifizierte Nageotte-Zählkammer, weiterhin der Blutbildautomat Abbott CD 3500 und schließlich eine durchflußzytometrische Methode am FACScan.
Mit Hilfe des präzisesten Messverfahrens wurden die konstante und periodische Trenn-grenzenposition am Blutzellseparator in Bezug auf die Leukozytenkonzentration in den Thrombozytapheresekonzentraten verglichen. Neben der Leukozytenkontamination wurden die Qualitätsparameter Plättchenausbeute und Separationseffizienz für beide Trenngrenzenpositionen ebenfalls ermittelt und vergleichend beurteilt.

# Kapitel II

# Material und Methoden

## 1. Charakterisierung der Probanden

Als Probanden dienten 100 regelmäßige Zytapheresespender der Blutspendezentrale der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität Berlin. Alle Spender entsprachen den "Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion" [89] sowie den "Empfehlungen der Hämapheresekommission der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie"[20].

Tabelle 1 informiert über allgemeine Daten des Probandenkollektivs, Tabelle 2 über hämatologische Parameter.

Tabelle 1: Allgemeine Daten der Thrombozytapheresespender

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Geschlecht : | [m/w] | 94 | / | 6 |
| Größe: | [cm] | 180 | ± | 6 |
| Gewicht: | [kg] | 77 | ± | 9 |

Tabelle 2: Hämatologische Daten der Thrombozytapheresespender

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Hämatokrit: | [l/l] | 0,43 | ± | 0,03 |
| Leukozyten: | [$10^9$/l] | 6,1 | ± | 1,6 |
| Thrombozyten: | [$10^9$/l] | 247 | ± | 46 |

Bei je 50 Thrombozytapheresen wurde das Standardprogramm mit konstanter Trenngrenze bzw. die Programm-Modifikation mit periodischer Trenngrenze eingesetzt.
Die Thrombozytenspenden erfolgten im Zeitraum Mai 1995 bis November 1995.

# 2. Charakterisierung der Thrombozytaphereseverfahren

## 2.1. Grundprinzipien und Aufbau der zweistufigen Thrombozytenseparationskammer des Blutzellseparators FRESENIUS AS 104

Die Blutkomponentenspende am Blutzellseparator FRESENIUS AS 104 erfolgt nach dem Prinzip der kontinuierlichen Separation des Spenderblutes.

Während der ständigen Entnahme von Spenderblut über eine periphere venöse Punktionsstelle und der Rückgabe der nicht benötigten Blutbestandteile über eine zweite periphere venöse Punktionsstelle erfolgt die Blutkomponentengewinnung. Spezielle Apherese-Sets existieren für die jeweiligen Blutkomponenten. Dabei handelt es sich um Kunststoffeinsätze im Sinne geschlossener Systeme.

Für die hier vorgestellte Untersuchung wurde der Blutzellseparator FRESENIUS AS 104, Softwareversion 4.7 mit dem Set C4L und der Separationskammer C4 eingesetzt. Die Separationskammer C4 ist zweistufig und starr (Abbildung 1). Sie verfügt über verschiedene Abflusskanäle für die aufgetrennten Blutkomponenten.

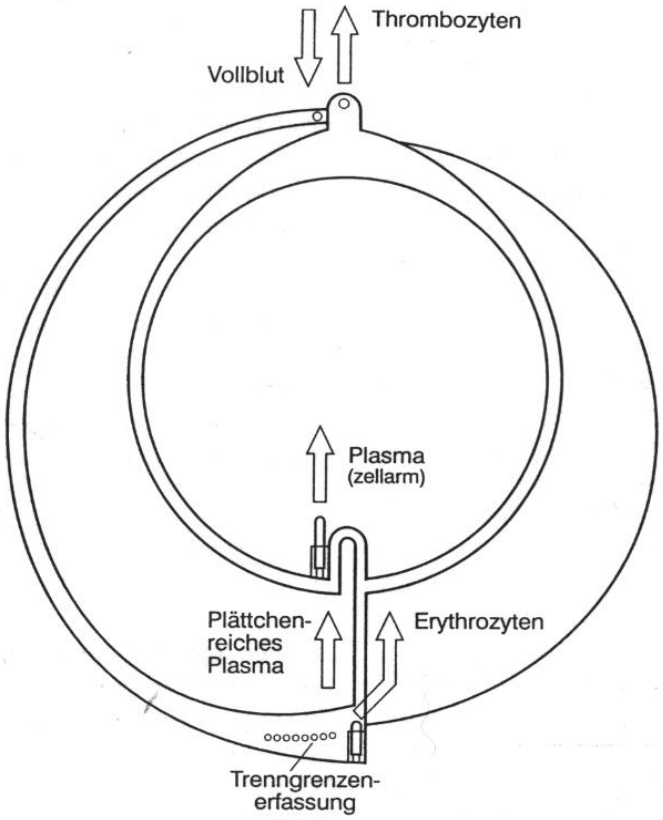


Abbildung 1: zweistufige Thrombozytenseparationskammer des Blutzellseparators Fresenius AS 104

Über den Vollblutschlauch wird das Spenderblut zusammen mit dem Antikoagulans ACD-A (Aqua-Citrat-Dextrose-A) in die äußere Kammer gepumpt. Die Blutkomponenten werden dort nach ihrer Dichte und Größe durch Zentrifugation aufgetrennt. Die Erythrozyten kommen so durch den leukozytenreichen buffy coat getrennt vom Plasma zu liegen, welches sich wiederum in plättchenreiches Plasma (PRP) und plättchenarmes Plasma (PPP) gliedert.

Die sedimentierten Erythrozyten und ein Teil des buffy coats fließen über den Erythrozyten-rückgabeschlauch passiv aus der ersten Kammer zum Spender zurück. Gleichzeitig befördert die Plasmapumpe das plättchenreiche Plasma (PRP) und das plättchenarme Plasma (PPP) aktiv von der ersten äußeren in die zweite innere Separationskammer. Hier werden dann die Thrombozyten als erwünschte Zellfraktion durch erneute Zentrifugation des PRP/PPP-Gemisches separiert und aktiv in einen externen Sammelbeutel gefördert. Die gleichzeitige Sammlung einer vorgegebenen Menge an Plasma ist prinzipiell möglich.

Tabelle 3 stellt die wichtigsten Variablen des Blutzellseparators und die Parametereinstellungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit vor.

Tabelle 3 : Parameter und Parametereinstellungen am Zellseparator

| | |
|---|---|
| Software-Version | 4.7 |
| Programm | Thrombozyten-Set (5 Tage Lagerung) |
| Apherese-Set | C4L (komplett mit Separationskammer und Beutelsystem) |
| Basislösung | NaCl 0.9% |
| Antikoagulans | ACD-A (750ml-Beutel)<br>Formula:<br>A: Aqua ad injectabile<br>C: Natriumcitrat-Monohydrat 2.2g<br>Natriumcitrat-Dihydrat 0.8g<br>D: Dextrose-Monohydrat 2.45g |
| Antikoagulation | ACD-A : Vollblut = 1 : 10 |
| Zentrifugendrehzahl | ≤ 2000U/min |
| Trenngrenzenposition | konstant: 6 : 2<br>periodisch: 4 : 4 / 6 : 2 |

## 2.2. Die Trenngrenzenposition

Die Position der durch die Zentrifugation erhaltenen Phasengrenze zwischen Zellsediment (Erythrozyten und leukozytenhaltiger buffy coat) und dem Plättchen-/ Plasmagemisch wird in der ersten Separationskammer optoelektronisch ermittelt.

Eine Lichtquelle mit acht spiralförmig angeordneten Lichtsignalen befindet sich im Bereich des Zellabzugs. Das Licht aus den einzelnen Lichtsignalen gelangt durch das lichtdurchlässige Plättchen-/Plasmagemisch zu dem sich senkrecht über der Separationskammer befindenden Detektor. Befinden sich nun aber Zellen (Erythrozyten oder Leukozyten) im Bereich der einzelnen Lichtsignale, wird das emittierte Licht von diesen Zellen absorbiert und gelangt nicht bis zum Detektor.

Die Position der Phasengrenze ergibt sich so aus der Verteilung von erkannten bzw. nicht erkannten Lichtsignalen. Die Einstellung der Trenngrenzenposition am Zellseparator gibt nun vor, wo sich die Phasengrenze in der Separationskammer befinden muß, damit die Plasmapumpe mit dem aktiven Abzug des Plättchen-/ Plasmagemisches beginnt. Während das Plasma-/Plättchen-gemisch abgepumpt wird, wird die aktuelle Phasengrenze in der Separationskammer ständig mit der durch die Trenngrenzenposition festgelegten Vorgabe verglichen. Wird der Anteil an Zellen zu hoch, bleibt die Plasmapumpe stehen, bis die Phasengrenze wieder im geforderten Bereich liegt.

Die Position der Trenngrenze bei der Thrombozytapherese mit dem Zellseparator FRESENIUS AS 104 wirkt sich auf die Extraktionseffizienz und die Kontamination der Thrombozytenkonzentrate aus [45].

Es ist das Ziel dieser Untersuchungen, die Reinheit der Thrombozytenkonzentrate bezüglich der Verunreinigungen mit Leukozyten, durch Veränderung der Trenngrenzeneinstellung zu verbessern.

### 2.2.1. Konstante und periodische Trenngrenzenposition

Konstante Trenngrenze bedeutet, daß während der gesamten Thrombozytapherese die Position der Phasengrenze auf 6 : 2 (Erythrozyten : Plasma) fest eingestellt bleibt.

Durch die weniger periphere Lage der Plasma-Zellgrenze bzw. die schmale Schicht des plättchenreichen Plasma wird ein hoher Zellgehalt an Thrombozyten und folglich auch eine hohe Separationseffizienz erreicht. Allerdings ist die Folge der schmalen Plasmaschicht eine größere Leukozytenkontamination im Thrombozytapheresekonzentrat.

In der Programm-Modifikation mit periodischer Trenngrenze soll versucht werden, die Leukozytenkontamination im Thrombozytenkonzentrat zu minimieren, jedoch eine möglichst hohe Separationseffizienz beizubehalten. Um das erreichen zu können, wird die Phasengrenze nicht konstant gehalten, sondern es werden Sammel- und Transferphasen unterschieden.
In der Sammelphase liegt die Phasengrenze bei der Einstellung 4 : 4 (Erythrozyten : Plasma), in der sich anschließenden Transferphase bei 6 : 2 (Erythrozyten : Plasma).

Hinter dem periodischen Wechsel der Trenngrenze steckt folgende Überlegung:

Das Verschieben der Trenngrenze in der Sammelphase auf die Position 4 : 4 bewirkt eine stärkere Sedimentation der Zellen, also der Erythrozyten und Leukozyten. Gleichzeitig findet eine bessere Trennung zwischen Thrombozyten und Leukozyten statt. Das Gemisch aus plättchenarmem Plasma (PPP) und plättchenreichem Plasma (PRP), das von der ersten in die zweite Separationskammer abgezogen wird, enthält weniger Leukozyten, aber auch weniger Thrombozyten. Mit der passageren Verschmälerung der Plasmaschicht in der Transferphase auf 6 : 2 (Erythrozyten : Plasma) wird vor allem die Thrombozytenschicht in die zweite Kammer überführt.

Die Dauer der Transferphase ist auf das Transfervolumen von 200 ml begrenzt. Drei Zyklen aus Sammel- und Transferphasen werden während der Thrombozytapheresen mit periodischer Trenngrenze durchlaufen.

### 2.4. Durchführung der Thrombozytapherese

Das Apherese-Set C4L, das komplett mit Separationskammer, Beutel- und Schlauch-systemen geliefert wird, wird in den Zellseparator FRESENIUS AS 104 eingelegt. Der Blutzellseparator wird danach mit der Antikoagulanzlösung ACD-A sowie 0,9%iger Natriumchloridlösung gefüllt. Für die Herstellung der 100 Thrombozytenkonzentrate wurden über das Spendermenü zwei verschiedene Voreinstellungen an der Fresenius AS 104 gewählt:

Für die ersten 50 Thrombozytenkonzentrate der Plättchen-Zielertrag von $3{,}3 \times 10^{11}$ pro Transfusionseinheit, für die restlichen 50 Plättchenkonzentrate die maximale Separationsdauer von 80 Minuten.

Das Gerät wird dafür über die Folientastatur bedient. Über einen Änderungsmodus erfolgen durchzuführende Parameteränderungen. Zuerst muß die Taste "Änderung", dann die Taste für den gewünschten Parameter bedient werden. Durch die Betätigung entsprechender Pfeiltasten kann der Sollwert erhöht oder erniedrigt werden. Das Gerät errechnet nach den eingegebenen Parametern die Änderungen des Blutflusses. Infolge der Parameterkopplung ändern sich alle anderen Flüsse und die Zentrifugendrehzahl mit, bis die Höchstdrehzahl erreicht ist.

Die Position der Trenngrenze, konstant oder periodisch, wird außen auf der Folientastatur des Zellseparators eingegeben. Das Separationsprogramm wird mit der Taste < Start > gestartet, die Pumpeneinstellung und die Steuerung der Zellkomponenten-Entnahme geschehen automatisch durch das Programm.
In der Einlaufphase ist zunächst die automatische Separation immer so lange ausgeschaltet, bis die Zellgrenze eine bestimmte Position erreicht hat.
Die Regelung der Trenngrenze erfolgt durch die Plasmapumpe.

Danach folgt der Programmstart.

Bei eingeschaltetem Drucker wird der Programmablauf automatisch ausgedruckt.

# 3. Probengewinnung

## 3.1. Gewinnung von Spenderblut vor der Thrombozytapherese

Nachdem der Zellseparator vorbereitet war, erfolgte die beidseitige periphere Venenpunktion. Zuerst wird die Vene an der Rückgabeseite punktiert. Es werden Blutproben für die Bestimmung von Hämatokrit und Thrombozytenzahl (Thrombozyten-Präwert) des Spenders vor Beginn der Thrombozytapherese abgenommen.

Danach erfolgt die Punktion der Vene an der Entnahmeseite mit der am System konnektierten Nadel.

## 3.2. Gewinnung von Spenderblut nach der Thrombozytapherese

Nach Beendigung der Thrombozytapherese wird das Schlauchsegment an der Rückgabeseite vom übrigen System abgetrennt. Das sich in diesem Segment befindliche Blut wird verworfen, um eine Verfälschung der Meßergebnisse durch das im System befindliche Antikoagulans zu verhindern. Danach werden Blutproben zur Ermittlung der Thrombozytenkonzentration (Thrombozyten-Postwert) im Spender entnommen.

## 3.3. Gewinnung von Thrombozytenkonzentrat nach der Thrombozytapherese

Nach gründlichem Durchmischen des Plättchenkonzentrats wird ein repräsentatives Schlauchsegment von 10 Zentimeter Länge vom Beutelsystem steril abgeschweißt.
Das Thrombozytapheresekonzentrat im entsprechenden Schlauchsegment kann nun in eine Sarstedt Monovette mit EDTA als Antikoagulans entleert werden. Kommt es zu einer Aggregatbildung von Thrombozyten im Thrombozytapheresekonzentrat, werden diese mit Hilfe des Flachbettagitators zur Auflösung gebracht.

# 4. Messmethoden

## 4.1. Durchflußzytometer FACScan

Prinzip

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension. Sie basiert auf der Messung von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften der Zellen [63]. Im Gegensatz zur Fluoreszenzmikroskopie erlaubt ein Durchflußzytometer die simultane Messung der relativen Zellgröße, der Granularität und maximal drei verschiedener Fluoreszenzfarben mehrerer tausend Einzelzellen in wenigen Sekunden.

Über einen angeschlossenen Computer werden die erhobenen Daten verarbeitet und gespeichert. Dafür werden die während der Messung auftretenden Lichtemissionen in numerische Signale umgesetzt.

Die Analyse der Zellen erfolgt in einem konstanten Flüssigkeitsstrom. Durch die umgebende Trägerflüssigkeit werden die Zellen beschleunigt, Zellaggregate aufgetrennt und die Zellen erreichen nacheinander den Analysepunkt. Dieser Vorgang wird hydro-dynamische Fokussierung genannt.

Am Analysepunkt trifft der monochromatische Laserstrahl auf die durchströmende Zelle. Die entstehenden Streulicht- und Fluoreszenzsignale werden mit Hilfe von Spiegel- und Filtersystemen erfaßt und können logarithmisch wie linear verstärkt werden.

Messung der Lichtstreuung

Die Lichtstreuung kommt durch die Wechselwirkung einer Zelle mit dem einfallenden Lichtstrahl zustande. Der größte Lichtanteil wird in Vorwärtsrichtung gestreut. Dieses Licht wird als Vorwärtsstreulicht [forward light scatter (FSC)] bezeichnet und ist ein Maß für die Zellgröße (d.h. kleine Zellen streuen weniger). Das im rechten Winkel zum einfallenden Laserstrahl gestreute Licht ist abhängig von der intrazellulären Granularität und von Oberflächeneigenschaften der Zellen; es wird Seitwärtsstreulicht [side scatter (SSC)] genannt.

Messung der Fluoreszenz

In der analytischen Durchflußzytometrie werden luftgekühlte Argon-Ionenlaser verwendet, die Licht einer Wellenlänge von 488 nm generieren. Deshalb werden in der Durchflußzytometrie vor allem Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die sich bei dieser Wellenlänge anregen lassen, jedoch verschiedene Emissionsmaxima besitzen.

Durch das Koppeln von Fluoreszenzfarbstoffen an monoklonale Antikörper, die gegen spezielle Antigene auf den zu analysierenden Zellen gerichtet sind, erfolgt die Zellidentifikation. Da hierbei Antigen-Antikörper-Reaktionen sichtbar werden, wird auch von Immunfluoreszenz als immunologische Nachweismethode gesprochen.

Antikörper

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des Durchflußzytometers die Größe der Leukozytenkontamination in Thrombozytenkonzentraten bestimmt.

Alle Leukozyten exprimieren das CD 45-Antigen, jedoch je nach Zellpopulation in verschiedenen Expressionsstärken. Das CD 14-Antigen ist überwiegend auf Monozyten und zum Teil auf neutrophilen Granulozyten nachweisbar.

Das jeweilige Thrombozytenkonzentrat wird in einem kleinen Aliquot mit monoklonalen Antikörpern gefärbt, die gegen diese Leukozyten-Antigene gerichtet sind. Zum Markieren der monoklonalen Antikörper wird die gebräuchliche Kombination der beiden Fluoreszenzfarbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) verwendet. D.h. zur Bestimmung der Leukozyten-Kontamination in den Thrombozytenkonzentraten werden FITC-markierte CD 45-Antikörper und PE-konjugierte CD 14-Antikörper eingesetzt.

Eichpartikel

Neben den Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften, die an den einzelnen Zellen analysiert werden, wird die genaue Bestimmung des Volumens, das durch die Meßkapillare während des Meßzeitraums geflossen ist, für die Errechnung der Leukozytenkontamination benötigt. Da es sich bei der Leukozytenkontamination im Thombozytenkonzentrat um eine sehr niedrige Zellkonzentration handelt, ist eine längere Meßdauer erforderlich.
Der Fluß des Probevolumens, vorgegeben mit ca. 60 Mikroliter pro Minute, kann nicht ausreichend konstant gehalten werden.
Durch den Einsatz von FACSCOUNT - Control - Eichpartikeln (930 beads pro Mikroliter) in vorgegebener Konzentration wird das Probenvolumen exakt bestimmbar [80, 24]. Über die Ermittlung des Verhältnisses der Zellen zu Eichpartikeln im Probenvolumen kann die Zellkonzentration errechnet werden.

Zur Bestimmung der Leukozytenkontamination im Thrombozytenkonzentrat wird die Probe mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern und beads in vorgegebener Konzentration versetzt.
Nach Inkubation der Probe und Erythrozytenlyse sowie erneuter Inkubation erfolgt ohne vorherige Zentrifugation die Messung am Durchflußzytometer. Die Geräteeinstellung erfolgt mit CaliBRITE beads (BDIS) und der Software FACSComp.

### 4.1.1. Präparation des Thrombozytapheresekonzentrates vor der durchfluß-zytometrischen Messung

50 Mikroliter des jeweiligen Thrombozytapheresekonzentrates werden aus der Sarstedt-Monovette in ein Falconröhrchen pipettiert.
In das Falconröhrchen werden weiterhin 50 Mikroliter beads ( FACSCOUNT-Control-Eichpartikel (BDIS), 930 beads/µl) und 5 Mikroliter Antikörper Anti-CD-45-FITC/Anti-CD-14-PE (Simultest-Leucogate, BDIS) gegeben. Diese Zellsuspension wird gründlich durchmischt und 20 Minuten inkubiert.

0,5 Milliliter Ortho-mune-lysing reagent (Ortho-Diagnostic Systems, Neckargemünd, Deutschland), je Ampulle aufgelöst in 100 ml Aqua dest., werden hinzugefügt, um die vorhandenen Erythrozyten in der Zellsuspension zu lysieren.

Die Messung am FACScan wird unmittelbar nach einer weiteren Inkubationszeit von 10 Minuten durchgeführt.

Für die Bestimmung der Leukozytenkonzentration im Thrombozytapheresekonzentrat wird eine Modifikation der Grundeinstellung des Durchflußzytometers FACScan (Becton Dickenson Immunocytometry (BDIS)) vorgenommen.
Ziel ist es, daß alle Zellen, die kein CD 45-Antigen exprimieren (alle Zellen außer Leukozyten), aus der Messung herausfallen.
Aus diesem Grund wird der Schwellenwert des Fluoreszenzkanals FL1 auf 300 eingestellt, so daß Ereignisse mit einer Fluoreszenz unterhalb des eingestellten Schwellenwertes nicht mehr erfaßt werden.
Im Programm Cellquest erfolgt die Datenerfassung. Bei jeder Messung werden entweder 10000 Ereignisse ermittelt oder die Messung bricht nach einer Meßdauer von 3 Minuten automatisch ab, um Sedimentationsvorgänge zu vermeiden.

Die Kalkulation der Leukozytenkonzentration im Thrombozytapheresekonzentrat erfolgt nach folgender Formel:

$$\mathbf{C_{Leuko} = \frac{E_{Leuko} \times V_{Eich} \times C_{Eich}}{E_{Eich} \times V_{Leuko}}}$$

$C_{Eich}$, $C_{Leuko}$ : Partikelkonzentration

$E_{Eich}$, $E_{Leuko}$ : Anzahl der Ereignisse

$V_{Eich}$, $V_{Leuko}$ : Probenvolumen

In die Formel werden die Eichpartikelkonzentration von 930 pro Mikroliter sowie die Probenvolumina von je 50 Mikroliter eingesetzt.
Aus der Gesamtzahl der 10000 Ereignisse (beads und Leukozyten) werden die jeweiligen Ereignisse in den entsprechenden Populationen am Durchflußzytometer ermittelt und die Berechnung der Zellkonzentration kann erfolgen.

### 4.1.2. Messung und Datenerfassung am Durchflußzytometer

Die Datenanalyse wird mit der Software Attractors (BDIS) durchgeführt. Die Daten für jede Zelle und jeden Parameter sind einzeln gespeichert ("list mode data"). Dies erlaubt die freie Korrelierbarkeit bei der Datenauswertung. Das ist die Voraussetzung für die prägnante Trennung der Leukozytenpopulationen bezüglich ihrer Streulichtparameter und der Antigenexpressionen.

Die Eigenfluoreszenz der beads ist sehr stark, so daß sie von fluoreszenzmarkierten Leukozyten gut zu unterscheiden sind.

Die Auswertung am FACScan erfolgt hierarchisch über die Prüfung und Zuordnung der einzelnen Zellpopulationen (beads, debris, Leukozyten).

Mit Ausnahme des Vorwärtsstreulicht werden alle Streulicht- und Fluoreszenzsignale logarithmisch verstärkt.

Mit der Software Attractors kann die Analyse von mehreren Parametern gleichzeitig bezüglich ihrer Korrelierbarkeit erfolgen. Die sogenannten Attractors sind ovale Populationsregionen, die um die einzelnen Leukozytengruppen gezogen werden, um diese zu definieren.

Bei der Auswertung der Meßergebnisse wird für jedes Ereignis geprüft, welcher Population das Ereignis angehört. Der Vorteil dieser Software liegt in der Möglichkeit der Unterscheidung von Zellpopulationen mit ähnlichen Eigenschaften (beispielsweise Monozyten und Lymphozyten), vorausgesetzt, sie differieren in mindestens einem erfaßten Parameter voneinander.

Die beiden folgenden Abbildungen zeigen die grafische Darstellung der Leukozytenpopulationen in Vollblut (Abbildung 2a) sowie in der Vollblut-Verdünnung von 1 : 1000 (Abbildung 2b).

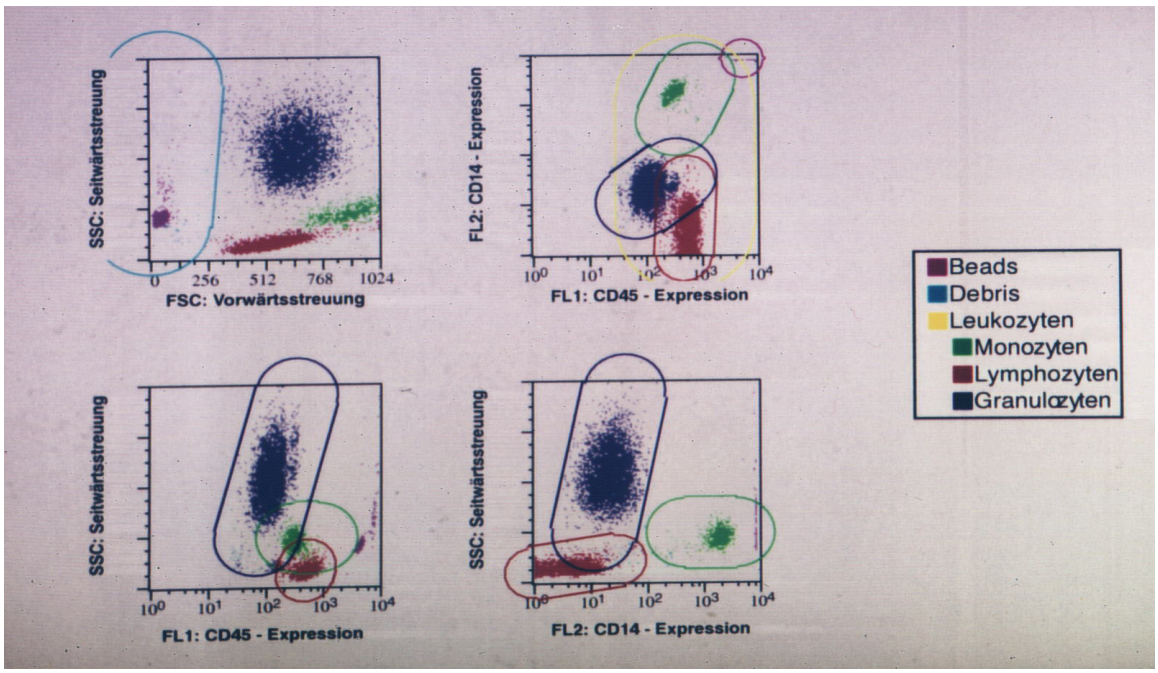


Abbildung 2 a: grafische Darstellung der Leukozytenpopulationen in Abhängigkeit von Streulichtparametern und Antigen-Expression im Vollblut

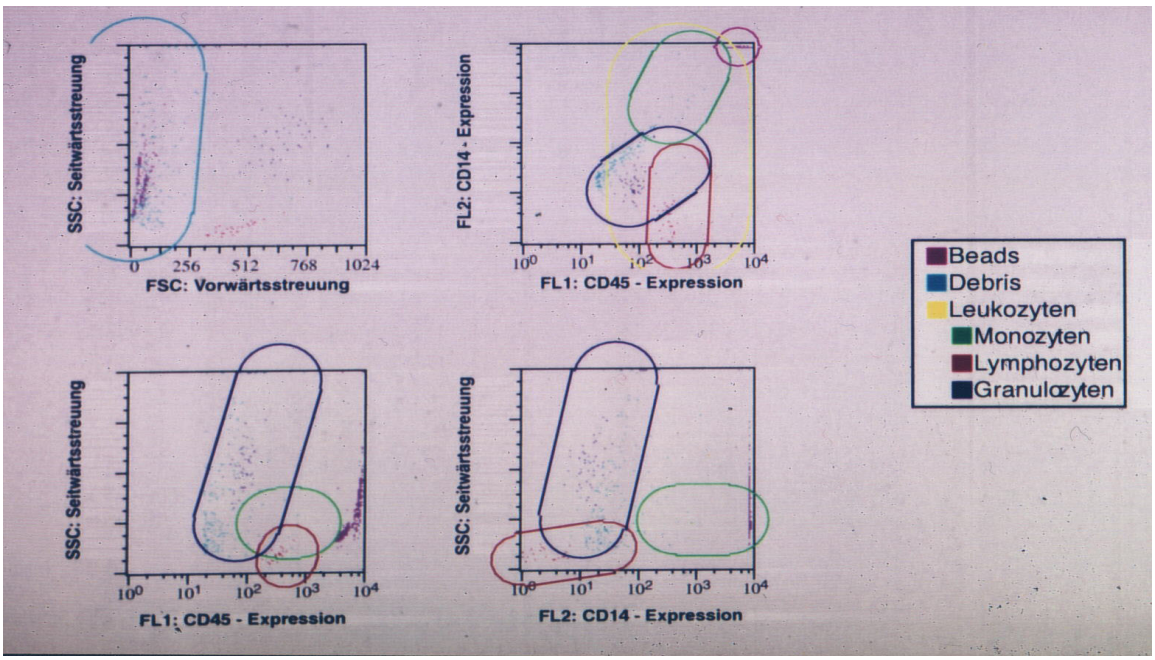


Abbildung 2b: grafische Darstellung der Leukozytenpopulationen in Abhängigkeit von Streulichtparametern und Antigenexpression im verdünnten Vollblut (1 : 1000)

## 4.2. Blutbildautomat Abbott Cell-Dyn 3500

Prinzip

Der Cell-Dyn 3500 (Abbott-Diagnostics) ist ein automatisch arbeitendes Mehrkanalgerät, das sowohl mit Laser-Lichtstreuung als auch mit Impedanztechnik arbeitet.

Das Hämoglobin wird mit einer Cyanmethämoglobin-Methode bestimmt, die Anzahl der Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten werden durch Impedanzmessungen ermittelt.
Wenn durch die Meßöffnung ein elektrischer Strom und ein Partikelstrom fließen, erhöht sich der elektrische Widerstand bei Durchtritt von Blutzellen, da sie Nichtleiter sind.
Diese Widerstandsänderung löst einen meßbaren elektrischen Impuls aus. Die Anzahl der Impulse entspricht der Anzahl der Zellen, die die Meßöffnung passiert haben. Die Amplitude des Impulses ist abhängig vom Volumen des Partikels.

Weiterhin wird die Leukozytenzahl im optischen Kanal (Laser) bestimmt und ein fünfteiliges Differentialblutbild erstellt. Wenn die Zellen mit dem Laserstrahl in Wechselwirkung treten, streuen sie das Laserlicht in alle Raumwinkel. Dabei verhalten sich die einzelnen Zellklassen in bezug auf die Streulicht-Intensität in einzelnen Winkelbereichen unterschiedlich.
Die Vorwärtsstreuung dient vorrangig zur Messung der Zellgröße. Mit Hilfe der Seitwärtsstreuung werden Informationen über die Zelloberfläche und den inneren Aufbau der Zellen gesammelt. Die von den Zellen ausgehenden optischen Signale werden gemessen und in elektrische Impulse umgewandelt, die dann im Computer gespeichert und ausgewertet werden können.

Die Bestimmung der Leukozytenzahl mit Hilfe zweier Methoden ermöglicht eine interne Qualitätskontrolle.
Die Leukozytenzahl, die im Impedanzkanal ermittelt wird, ist bei Anwesenheit von kernhaltigen Erythrozyten fälschlicherweise erhöht.

Bei der Messung der Leukozyten im optischen Kanal wird dagegen durch die Einführung eines mobilen Schwellenwertes diese Zellart vernachlässigt.
Da aber der optische Kanal schwächere lytische Lösungen verwendet, sind die Leukozytenzahlen bei Anwesenheit von osmotisch resistenten Erythrozyten (z.B. in neonaten Blutproben) fälschlicherweise erhöht.

Grundsätzlich vergleicht der Cell-Dyn die bei jeder Leukozyten-Messung ermittelten Werte aus den beiden Leukozyten-Kanälen und korrigiert gegebenenfalls die Ergebnisse.

Die Kombination der beiden verschiedenen Meßverfahren speziell für die Leukozyten-Bestimmung reduziert Störungen bei atypischen oder pathologisch veränderten Proben.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Messungen am Cell-Dyn durchgeführt:

1. der Hämatokrit-Wert des Spenders vor der Konzentrat-Spende
2. der Thrombozyten-Präwert (vor der Spende) und der Thrombozyten-Postwert (nach der Spende) des Spenders
3. die Thrombozytenkonzentration im Thrombozytapheresekonzentrat
4. die Leukozytenkonzentration im Thrombozytapheresekonzentrat.

### 4.2.1. Präparation des Thrombozytapheresekonzentrates vor der Messung

Nachdem die Thrombozytapherese abgeschlossen ist, wird von dem Konzentratbeutel ein repräsentatives Schlauchsegment abgeschweißt und das darin enthaltene Thrombozytapheresekonzentrat in eine Sarstedt Monovette (Antikoagulans: EDTA) gefüllt. Aus der Sarstedt Monovette erfolgt die Probenentnahme für die Bestimmung des Thrombozytenwertes und der Leukozytenkonzentration im Thrombozytapheresekonzentrat.

## 4.3. Nageotte-Zählkammer

Prinzip

Die Ermittlung von Leukozytenkonzentrationen in leukozytendepletierten Thrombozytapherese-konzentraten ist mit Standard-Zählkammern (Neubauer, Bürker) nicht möglich, da Leukozytenkonzentrationen unter 10 pro Mikroliter nicht mit ausreichender Genauigkeit bestimmt werden können [40, 4].

Deshalb ist in dieser Arbeit die large-volume-Nageotte Counting chamber (COBE BCT Nageotte modified BRIGHT-Line (metalized) counting chamber ) benutzt worden [39, 40, 50].

Die Kammertiefe der Nageotte-Kammer beträgt 0,5 mm, während Standard-Zählkammern für Blutzellen nur 0,1 mm tief sind. Bei der Nageotte-Kammer handelt es sich um eine modifizierte Zählkammer, die einen metallischen Überzug besitzt und über zwei Zählnetze verfügt. Jedes Zählnetz besitzt 40 Reihen, was einem Volumen von 50 Mikrolitern entspricht.

Das Thrombozytapheresekonzentrat wird zur Hämolyse eventuell noch vorhandener einzelner Erythrozyten mit Essigsäure versetzt und gleichzeitig verdünnt, so daß die Leukozyten in der Zählkammer mikroskopisch als solche zu erkennen sind.

### 4.3.1. Präparation des Thrombozytapheresekonzentrates vor der Zellzählung in der Zählkammer

In ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (2,0 ml mit Deckel) werden 100 Mikroliter Thrombozytenkonzentrat pipettiert, um danach 400 Mikroliter 0,5 M Essigsäure hinzuzufügen. Danach erfolgt ein sorgfältiges Mischen der Lösung.

Die Zählkammer, insbesondere die Seitenstege und das Gebiet der beiden Zählnetze sowie das Deckglas werden mit einem trockenen Lappen sorgfältig von Fett und Staub befreit. Dann wird das Deckglas vorsichtig auf die Stege geschoben. Durch leichtes Hin- und Herschieben entstehen Newtonsche Farbringe auf den beiden Stegen im Bereich der Deckglasauflage

Die Haftfähigkeit des Deckglases auf der Kammer ist bei gutem Sitz so groß, daß es nur durch Kippen um eine seiner Kanten wieder entfernt werden kann.

Nun wird die Lösung erneut gemischt.

Für das vorsichtige Einfüllen der Probe in die beiden Zählnetze ( je 50 Mikroliter) der Nageotte-Kammer wird eine 100 Mikroliter Pipette (Eppendorf) verwendet. Nach zehnminütiger Wartezeit für die Sedimentation der Leukozyten in der Kammer erfolgt die vorsichtige Plazierung der Nageotte-Kammer unter einem Mikroskop LEITZ DM IL (Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar).

### 4.3.2. Auszählung der Leukozyten in der Nageotte-Zählkammer; Berechnung

Bei 20er Vergrößerung erfolgt die Auszählung der Leukozyten unter dem Mikroskop.

Ein Zählnetz besitzt 40 Reihen, was einem Volumen von 50 Mikroliter entspricht.

Befindet sich das Zählergebnis zwischen 0 und 10 Leukozyten, werden die Leukozyten des zweiten Zählnetzes ermittelt.

Berechnung:

$$\text{Leukozyten pro Mikroliter} = \frac{\text{gezählte Zellen x Verdünnung}}{\text{Volumen d. Zählkammer}}$$

# 5. Auswertung

Die Auswertung umfaßt folgende Kriterien:

1. den Absolutertrag an Thrombozyten (Ausbeute)

2. die Separationseffizienz

3. die Separationsleistung

4. die Leukozytenkontamination

## 5.1. Parameterermittlung und Berechnungen

Um die obenstehende Größen berechnen zu können, müssen folgende Parameter ermittelt werden:

Separationsdauer und Separationsvolumen werden aus dem jeweiligen Apherese-Protokoll des Blutzellseparators abgelesen. Das Volumen des Thrombozytapheresekonzentrates wird mittels Wiegen und Division durch die Dichte (1,026g/cm ) errechnet.

Die Leukozyten- und Thrombozytenkonzentration im Spenderblut wie auch im Thrombozyt-apheresekonzentrat ist am Ausdruck des Blutbild-Automaten Abbott CD 3500 zu erkennen.

Die Leukozytenkonzentration im Thrombozytapheresekonzentrat wird mit Hilfe der Nageotte-Kammer gezählt bzw. mittels Durchflußzytometer bestimmt.

Die Berechnungen werden im folgenden dargestellt:

1. <u>Absolutertrag an Thrombozyten</u> (TE)

TE = Konzentratvolumen x Thrombozytenkonzentration im Konzentrat

2. Separationseffizienz (SE)

$$SE = \frac{\text{Absolutertrag an Thrombozyten}}{\text{(Separationsvolumen x mittlere Thrombozytenkonzentration im Spenderblut)}}$$

3. Separationsleistung (SL)

$$SL = \frac{\text{Absolutertrag an Thrombozyten}}{\text{Separationsdauer}}$$

4. Leukozytenkontamination (LK)

LK = Konzentratvolumen x Leukozytenkonzentration im Konzentrat

## 6. Statistik

Die Statistik-Software SPSS für Windows, Version 6.0., wurde für die statistische Auswertung angewandt.

In beiden Separationsverfahren wurden die einzelnen Meßgrößen auf Normalverteilung mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft.

Mit dem nächsten Schritt erfolgte der statistische Vergleich der Mittelwerte der Meßgrößen für beide Separationsverfahren.
Konnten mit dem oben beschriebenen Verfahren normalverteilte Meßgrößen angenommen werden, wurde der t-Test für unabhängige Stichproben genutzt.

Mußte eine Normalverteilung der jeweiligen Meßgröße in einer der beiden Gruppen abgelehnt werden, wurde der Mann-Whitney U-Test angewandt.

Folgende Nullhypothese wurde für den statistischen Vergleich der beiden Separationsverfahren aufgestellt: In den gemessenen Stichproben finden sich Grundgesamtheiten mit gleichem Mittelwert, d.h. es gibt bezüglich der Meßgrößen in beiden Separationsverfahren keinen Unterschied.

Die Nullhypothese wird bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ verworfen.

# Kapitel III

# Ergebnisse

## 1. Einteilung der Meßergebnisse

Um eine ausreichende Übersichtlichkeit zu wahren, werden im folgenden die Meßergebnisse in Ausgangswerte, Thrombozytapherese- und Effektivitätsparameter eingeteilt.

### 1.1. Ausgangswerte

In der folgenden Tabelle 4 finden sich die Ausgangswerte aus beiden Separationsverfahren.

Tabelle 4: Mittelwerte, Standardabweichungen, minimale und maximale Werte der entsprechenden Meßgrößen aus beiden Separationsverfahren

| Meßgröße | Einheit | konstante Trenngrenze | | Periodische Trenngrenze | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Mittelwert ± Standardab-Weichung | Min Max | Mittelwert ± Standardab-Weichung | Min Max |
| Thrombozyten vor Apherese | $10^9$/l | 251 ± 43 | 158 360 | 243 ± 49 | 154 418 |
| Leukozyten vor Apherese | $10^9$/l | 6,2 ± 1,7 | 3,4 10,1 | 6,0 ± 1,6 | 3,8 10,8 |

Der statistische Vergleich der Ausgangswerte Thrombozyten- und Leukozytenkonzentration ergibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Separationsverfahren.

### 1.2. Thrombozytaphereseparameter

In Tabelle 5 sind die Thrombozytaphereseparameter aus beiden Separationsverfahren ersichtlich.

Tabelle 5: Mittelwerte, Standardabweichungen, minimale und maximale Werte der Thrombozytaphereseparameter aus beiden Separationsverfahren

| Meßgröße | Einheit | konstante TG | | Periodische TG | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Mittelwert ± Standardab-weichung | Min Max | Mittelwert ± Standardab-Weichung | Min Max |
| Separations-volumen | ml | 3588 ± 499 | 2570 4820 | 3737 ± 533 | 2680 5600 |
| Separations-dauer | min | 63 ± 12 | 43 105 | 64 ± 9 | 45 94 |
| Konzentrat-volumen | ml | 284 ± 22 | 226 356 | 286 ± 13 | 233 336 |

Der statistische Vergleich der drei Thrombozytaphereseparameter Separationsvolumen (t-Test: p = 0,152), Separationsdauer (t-Test: p = 0,637) und Konzentratvolumen (U-Test: p = 0,4889) zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Separationsverfahren.

### 1.3. Effektivitätsparameter

Tabelle 6 zeigt die Effektivitätsparameter, die nach Thrombozytapherese mit konstanter und periodischer Trenngrenzenposition ermittelt wurden.

Tabelle 6: Mittelwerte, Standardabweichungen, minimale und maximale Werte der einzelnen Meßgrößen aus beiden Separationsverfahren

| Meßgröße | Einheit | konstante Trenngrenze | | | Periodische Trenngrenze | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Mittelwert ± Standardab-weichung | Min | Max | Mittelwert ± Standardab-Weichung | Min | Max |
| Thrombozyten-Ertrag | $10^{11}$/TE | 3,6 ± 0,8 | 2,4 | 7,3 | 3,3 ± 0,7 | 2,0 | 5,6 |
| Separations-Leistung | $10^{9}$/min | 5,9 ± 1,4 | 3,6 | 10,4 | 5,2 ± 1,4 | 3,0 | 9,8 |
| Separations-effizienz | % | 48,0 ± 8,7 | 35,3 | 81,7 | 43,3 ± 7,6 | 26,8 | 68,2 |
| Leukozyten im Konzentrat (Abbott CD 3500) | 1/µl | 58,8 ± 43,1 | 0 | 213 | 18,9 ± 17,9 | 0 | 66 |
| Leukozyten im Konzentrat (Nageotte-Kammer) | 1/µl | 17,2 ± 19,5 | 0,8 | 116 | 7,3 ± 13,6 | 1,2 | 93,2 |
| Leukozyten im Konzentrat (FACScan) | 1/µl | 17,4 ± 22,2 | 0,1 | 33,5 | 4,1 ± 19,7 | 0 | 139,4 |
| Leukozyten-Kontamination (Nageotte-Kammer) | $10^{6}$/TE | 4,9 ± 5,6 | 0,2 | 33,5 | 2,1 ± 3,9 | 0,3 | 26,9 |
| Leukozyten-Kontamination (FACScan) | $10^{6}$/TE | 4,9 ± 6,3 | 0 | 35,3 | 1,2 ± 5,7 | 0 | 40,2 |

### 1.3.1. Thrombozytenausbeute

Der Absolutertrag an Thrombozyten liegt bei Anwendung der konstanten

Trenngrenze im Mittel bei 3,6 x $10^{11}$ pro Thrombozytenkonzentrat. Im Separationsverfahren mit periodischer Trenngrenze beträgt der Mittelwert für den Thrombozytenertrag 3,3 x $10^{11}$ pro Plättchenkonzentrat (t-Test: p = 0,017).

Damit gibt es bei Anwendung der konstanten Trenngrenze für den Parameter Thrombozytenertrag ein um 0,3 x $10^{11}$ signifikant höheres Ergebnis als beim

Separationsverfahren mit periodischer Trenngrenze.

Abbildung 3 zeigt die zugehörigen Histogramme.

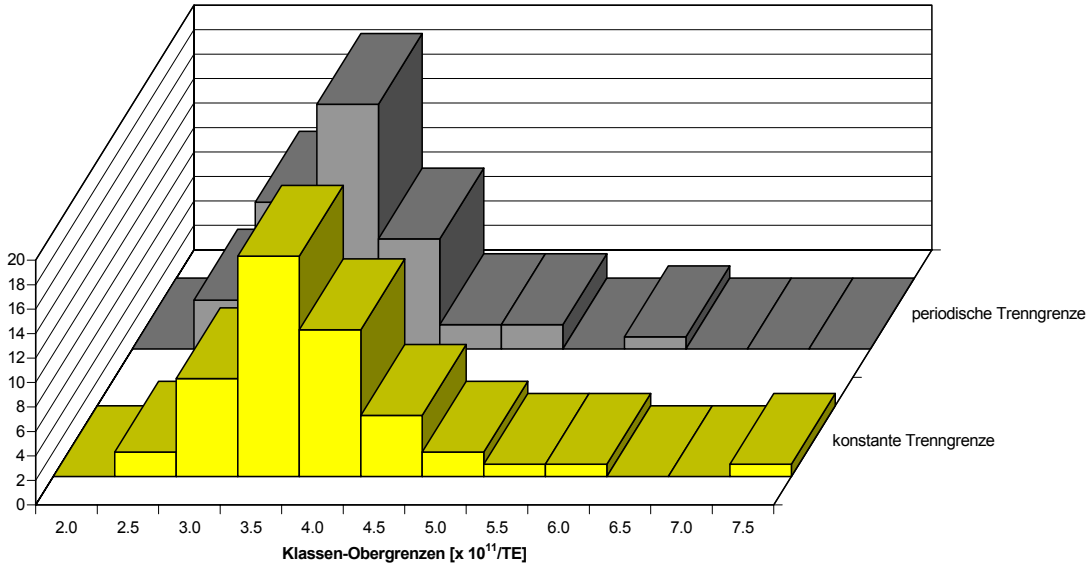


Abbildung 3: Häufigkeitsverteilung für den Parameter Thrombozytenertrag für beide Separationsverfahren

### 1.3.2. Separationsleistung und Separationseffizienz

Der statistische Vergleich mit Hilfe des t-Tests ergibt für die Separationsleistung ein P von 0,018 und für die Separationseffizienz ein P von 0,005.

Es resultiert eine signifikant niedrigere Separationsleistung wie auch eine signifikant niedrigere Separationseffizienz bei dem Separationsverfahren mit periodischer Trenngrenze.

Das Histogramm für die Häufigkeitsverteilung der Separationsleistung stellt Abbildung 4 dar.

Nach Anwendung der periodischen Trenngrenze wurden in der Mehrzahl der Thrombozytenkonzentrate Separationsleistungen von 5 x $10^9$/min ermittelt, während im Separationsverfahren mit konstanter Trenngrenze die Separationsleistungen einen Peak bei 6 x $10^9$/min zeigen.

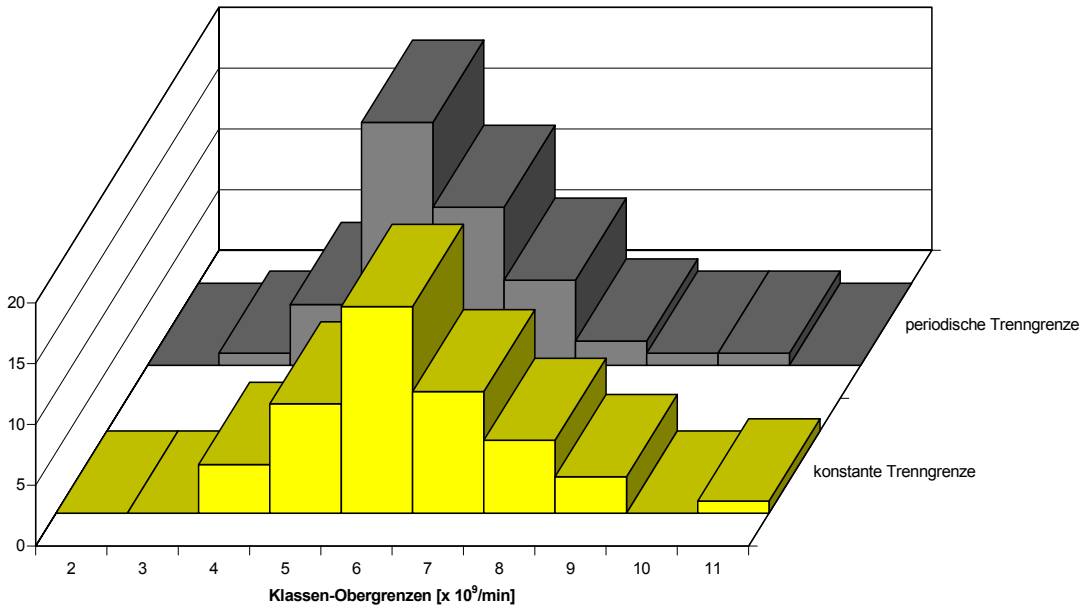


Abbildung 4: Häufigkeitsverteilung für den Parameter Separationsleistung für das Separationsverfahren mit periodischer und konstanter Trenngrenze

Abbildung 5 zeigt die Häufigkeitsverteilung des Parameters Separationseffizienz in beiden Separationsverfahren. Bei Anwendung der periodischen Trenngrenze liegt die Separationseffizienz mehrheitlich unter 50%, bei der konstanten Trenngrenze um 50%.

Weitaus höhere Separationseffizienzen (bis zu 85%) finden sich beim Separations-verfahren mit konstanter Trenngrenze, vor allem deutlich öfter als bei Anwendung der periodischen Trenngrenze.

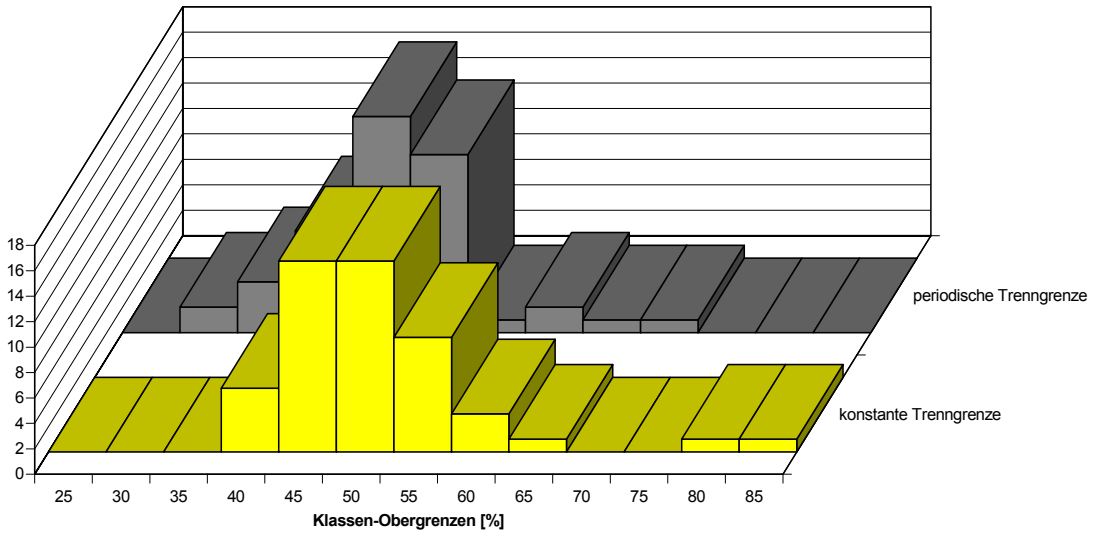


Abbildung 5: Häufigkeitsverteilung des Parameters Separationseffizienz in beiden Separationsverfahren

### 1.3.3. Leukozytenkontamination

Die Leukozytenkontamination als weiterer Effektivitätsparameter weicht im Vergleich beider Thrombozytapherese-Verfahren signifikant voneinander ab.

Bei Anwendung der konstanten Trenngrenze findet sich eine Leukozytenkontamination von im Mittel 4,9 x $10^6$ pro Plättchenkonzentrat, sowohl in der Nageotte-Kammer als auch im Durchflußzytometer.

Beim Thrombozytapherese-Verfahren mit periodischer Trenngrenze liegt die Leukozytenkontamination in der Nageotte-Kammer im Mittel bei 2,1 x $10^6$ pro Plättchenkonzentrat und im Durchflußzytometer bei 1,2 x $10^6$ pro Thrombozytenkonzentrat, was einem signifikant niedrigeren Ergebnis entspricht (U-Test: P = 0,0001).

Abbildung 6 zeigt, das Leukozytenkontaminationen, die mit Hilfe der Nageotte-Kammer gezählt wurden, beim Separationsverfahren mit periodischer Trenngrenze bei deutlich niedrigeren Werten liegen. Dabei finden sich hauptsächlich Leukozytenkontaminationen von 1 x $10^6$ bis 2 x $10^6$ pro Plättchenkonzentrat.

Nach Anwendung der konstanten Trenngrenze liegen die Leukozytenkontaminationen im wesentlichen zwischen 1 x $10^6$ und 9 x $10^6$ pro Thrombozytenkonzentrat, also deutlich höher.

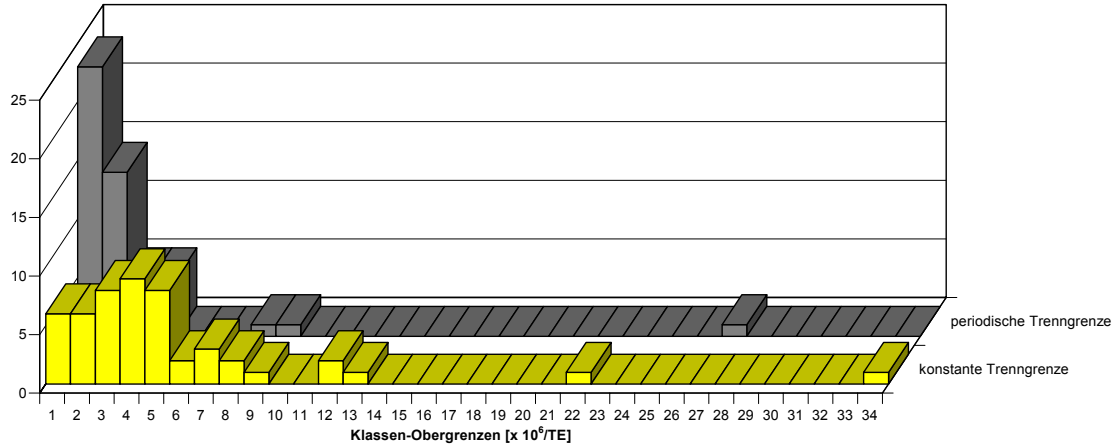


Abbildung 6: Größe der Leukozytenkontaminationen (Nageotte-Zählkammer) in beiden Separationsverfahren

Abbildung 7 veranschaulicht, daß Leukozytenkontaminationen, die mit Hilfe des Durchflußzytometers ermittelt wurden, beim Separationsverfahren mit periodischer Trenn-grenze signifikant niedriger sind. Bei den meisten Messungen beträgt der Wert 1 x $10^6$ Leukozyten pro Plättchenkonzentrat. Im Vergleich dazu liegen bei Anwendung der konstanten Trenngrenze die Leukozytenkontaminationen im wesentlichen zwischen 1 x $10^6$ und 8 x $10^6$ pro Thrombozytenkonzentrat.

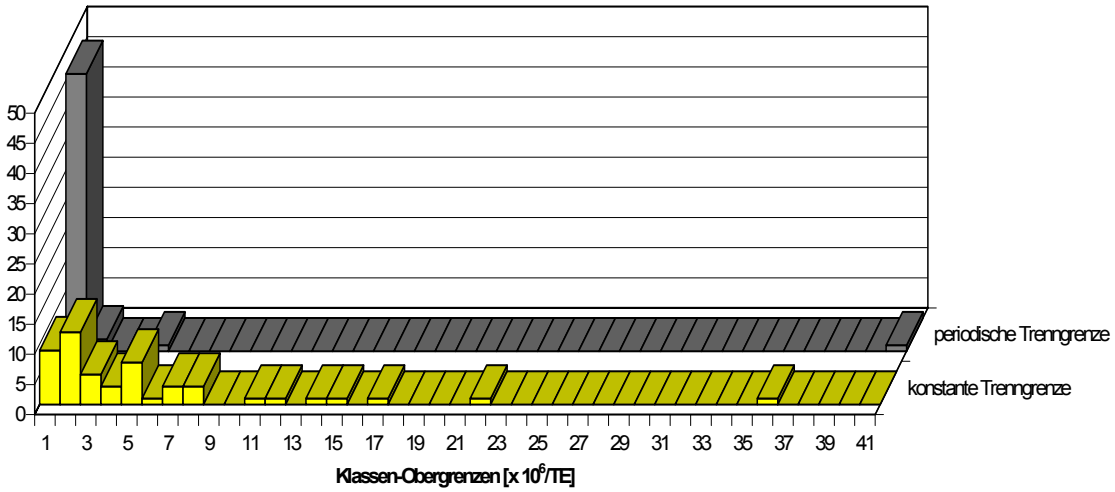


Abbildung 7: Größe der Leukozytenkontaminationen (FACS) im Separationsverfahren mit konstanter und periodischer Trenngrenze

Die in Histogrammen zusammengefaßten Einzelwerte in den Abbildungen 6 und 7 zeigen, daß sich vor allem bei niedrigen Leukozytenkonzentrationen die Leukozytenkontaminationen, die mittels Durchflußzytometer und Nageotte-Kammer bestimmt wurden, unterscheiden.
Dabei liegen die Werte, die mit Hilfe des Durchflußzytometers bestimmt wurden, unter denen, die mit der Nageotte-Kammer gezählt wurden.

Die "critical immunologic load of leucocytes"(cill) beträgt 1 x $10^6$ Leukozyten pro Plättchen-konzentrat. Beim Separationsverfahren mit periodischer Trenngrenze liegen in dieser Arbeit die Leukozytenkontaminationen bei 22 Messungen mit der Nageotte-Kammer bzw. sogar bei 46 Messungen mit dem Durchflußzytometer unter dem cill-Wert von 1 x $10^6$ pro Plättchenkonzentrat. Dagegen gibt es bei Anwendung der konstanten Trenngrenze nur 6 Messungen mit der Nageotte-Kammer und 9 Messungen mit dem Durchflußzytometer, die mit ihrer Leukozytenkontamination unter dem cill-Wert von 1 x $10^6$ pro Plättchenkonzentrat bleiben.

Bei insgesamt 17 Messungen am Durchflußzytometer überschritt die Leukozyten-konzentration in mit konstanter Trenngrenze hergestellten Thrombozytapherese-konzentraten die obere Grenze des cill-Wertes von 5 x $10^6$ Leukozyten pro Plättchenkonzentrat.

Je ein Ausreißer mit erheblich höherer Leukozytenkontamination in den Thrombozytapherese-konzentraten findet sich bei beiden Separationsverfahren. Der Wert beträgt für die periodische Trenngrenze 40,2 x $10^6$ Leukozyten pro Transfusionseinheit und für die konstante Trenngrenze 35,3 x $10^6$ Leukozyten pro Transfusionseinheit.

## 2. Korrelation der drei Meßmethoden: modifizierte Nageotte-Zählkammer, FACScan und Blutbildautomat CD 3500 Abbott

Auf der Basis des genauesten der drei Zählverfahren soll in der vorliegenden Arbeit der Vergleich der beiden Trenngrenzenpositionen am Zellseparator FRESENIUS AS 104 erfolgen.

### 2.1. Korrelation zwischen Nageotte-Kammer und Blutbildautomat Abbott CD 3500

Tabelle 7 zeigt die Höhe der Leukozytenkonzentration in den Thrombozytapherese-konzentraten im Vergleich zwischen Nageotte-Zählkammer und dem Blutbildautomaten Abbott CD 3500.

Tabelle 7: Leukozytenkonzentrationen in den Thrombozytapheresekonzentraten (konstante und periodische Trenngrenze) nach der Messung am Blutbildautomat Abbott CD 3500 bzw. nach Zählung in der Nageotte-Kammer

| Meßgröße | Einheit | Konstante TG | periodische TG |
|---|---|---|---|
| Leukozyten im Kon-zentrat (Nageotte) | 1/µl | 17,2 ± 19,5 | 7,3 ± 13,6 |
| Leukozyten im Kon-zentrat (Abbott) | 1/µl | 58,8 ± 43,1 | 18,9 ± 17,9 |

Abbildung 8 soll demonstrieren, daß für beide Trenngrenzenpositionen (konstant und periodisch) der Blutbildautomat Abbott CD 3500 erheblich höhere Leukozytenkon-zentrationen in den Plättchenkonzentraten gemessen hat, als mit Hilfe der Nageotte-Kammer gezählt wurden. Der sehr niedrige Korrelationskoeffizient von 0,546 ist Ausdruck für die unzureichende Genauigkeit des Blutbildautomaten Abbott CD 3500.

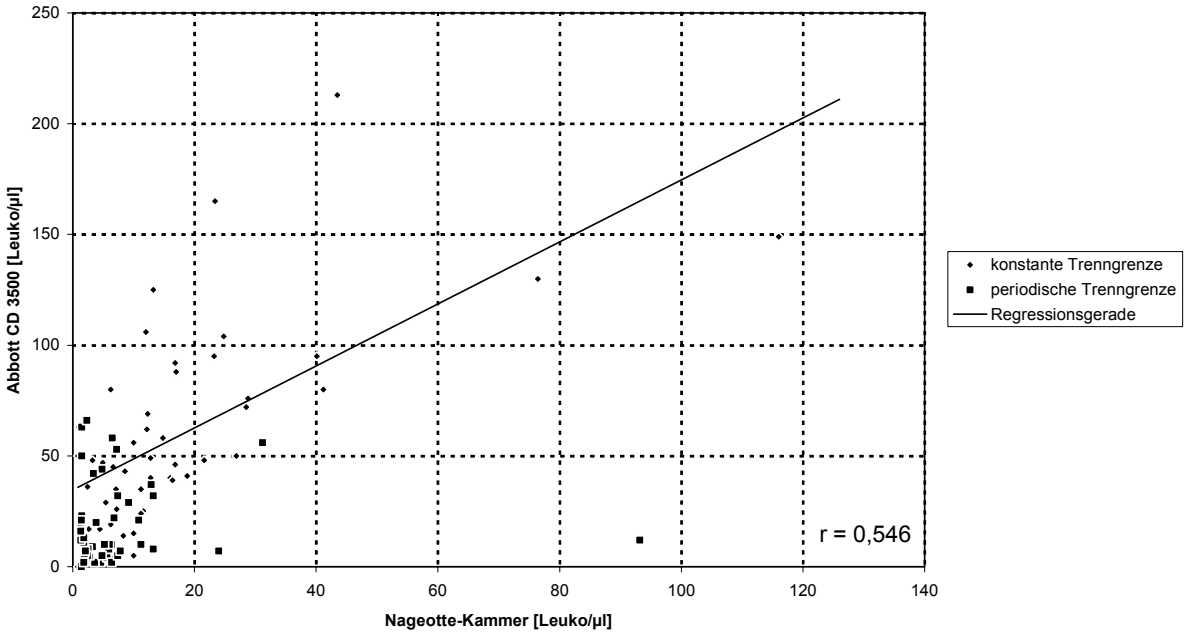


Abbildung 8: Grafischer Vergleich der Leukozytenkonzentrationen in den Thrombozyt-apheresekonzentraten (Nageotte-Kammer und Blutbildautomat CD 3500)

## 2.2. Korrelation zwischen Nageotte-Kammer und FACScan

Tabelle 8 stellt die Höhe der Leukozytenkonzentrationen in den Thrombozytapherese-konzentraten (konstante und periodische Trenngrenzenposition) dar, die mit Hilfe der Nageotte-Kammer gezählt bzw. am Durchflußzytometer gemessen wurden.

Tabelle 8: Leukozytenkonzentrationen in den Thrombozytapheresekonzentraten (konstante und periodische Trenngrenze) nach der Messung am Durchflußzytometer bzw. nach Zählung in der Nageotte-Zählkammer

| Meßgrösse | Einheit | konstante TG | Periodische TG |
|---|---|---|---|
| Leukozyten im Konzentrat (Nageotte-Kammer) | 1/µl | 17,2 ± 19,5 | 7,3 ± 13,6 |
| Leukozyten im Konzentrat (FACS) | 1/µl | 17,4 ± 22,2 | 4,1 ± 19,7 |

Abbildung 9 zeigt, dass der Vergleich zwischen den beiden Meßmethoden Nageotte-Kammer und FACS eine große Übereinstimmung bezüglich der ermittelten Leukozytenkonzentrationen in den Thrombozytapheresekonzentraten ergab. Der Korrelationskoeffizient von 0,93 repräsentiert das anschaulich.
Bei Leukozytenkonzentrationen unter 10 pro Mikroliter Plättchenkonzentrat resultierten aus der durchflußzytometrischen Messung allerdings deutlich niedrigere Leukozytenzahlen als bei Zählung mit Hilfe der Nageotte-Kammer.

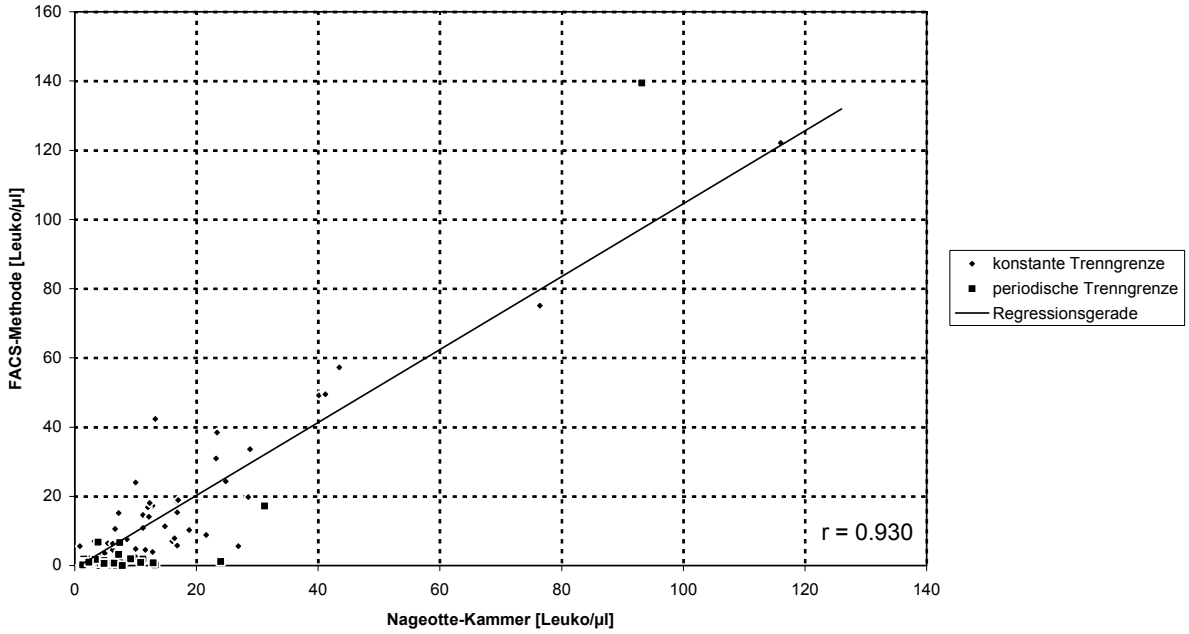


Abbildung 9: Grafischer Vergleich der Leukozytenkonzentrationen in den Thrombozyt-apheresekonzentraten (Nageotte-Kammer und FACS)

# Kapitel IV

# Diskussion

Die Position der Trenngrenze bei der Thrombozytapherese mit dem Zellseparator FRESENIUS AS 104 wirkt sich auf die Extraktionseffizienz und die Leukozytenkontamination der Thrombozytenkonzentrate aus.

Es ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Reinheit der Präparate durch Veränderungen der Trenngrenzen-Einstellung zu verbessern. Dabei sollte die Leukozytenkontamination regelmäßig unter der kritischen Grenze von $1 \times 10^6$ Leukozyten pro Konzentrat (cill-Wert) liegen, damit die Alloimmunisierungsrate gegen Null reduziert werden kann [67, 84] bzw. auf die kostenintensive Leukozytendepletion mittels spezieller Filter verzichtet werden kann.

Für zahlreiche Studien am Zellseparator FRESENIUS AS 104 wurde die Trenngrenzenposition bei den Thrombozytapheresen auf die Standardposition 6 : 2 und 7 : 1 eingestellt [5, 31, 33, 35, 46, 58, 81].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine modifizierte periodische Trenngrenzen-Einstellung von 4 : 4 / 6 : 2 untersucht und der konstanten Standard-Trenngrenzen-Position von 6 : 2 gegenübergestellt. Dabei wurden 50 Thrombozytapheresen mit konstanter und 50 Thrombozytapheresen mit periodischer Trenngrenzenposition durchgeführt und die Thrombozytenkonzentrate anschließend auf ihren Gehalt an kontaminierenden Leukozyten überprüft.

Das methodische Problem besteht in der Messung von Leukozytenkontaminationen in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich, wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall ist. Deshalb wurden in dieser Untersuchung zur genauen Ermittlung der Leukozytenkonzentrationen in den einzelnen Thrombozytenkonzentraten der Nageotte-Zählkammer als "Gold-Standard" zwei weitere alternative Meßmethoden, das Durchflußzytometer FACScan und ein neuartiger Blutbildautomat, Abbott CD 3500, gegenübergestellt.

Anhand der Ergebnisse dieser drei Meßmethoden erfolgte die Einschätzung des genauesten Zählverfahrens zur Bestimmung der Leukozytenkonzentrationen in Plättchenkonzentraten.
Auf der Basis des entsprechenden Zählverfahrens wurde der Vergleich der beiden Trenngrenzenpositionen am Zellseparator FRESENIUS AS 104 vorgenommen.

Neben dem Vergleich der Leukozytenkontaminationen in den Thrombozytenkonzentraten wurden die Effektivitätsparameter Separationseffizienz und Thrombozytenausbeute für beide Trenngrenzenpositionen ermittelt und einander gegenübergestellt.

## 1. Methodenvergleich Leukozytenzählung

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der modifizierten Nageotte-Kammer für das Separationsverfahren mit konstanter Trenngrenze Leukozytenkonzentrationen von 17,2 ± 19,5 pro Mikroliter Thrombozytenkonzentrat bzw. für die periodische Trenngrenze 7,3 ± 13,6 Leukozyten pro Mikroliter Plättchenkonzentrat gezählt.

Im Vergleich dazu lagen die Werte, die mit dem Blutbildautomaten Abbott CD 3500 gemessen wurden, erheblich höher. Für die konstante Trenngrenze wurden Leukozytenkonzentrationen von 58,8 ± 43,1 pro Mikroliter Thrombozytenkonzentrat gemessen, für die Separation mit periodischer Trenngrenzeneinstellung 18,9 ± 17,9 Leukozyten pro Mikroliter Plättchenkonzentrat.

Abbildung 8 (siehe Ergebnisteil) zeigt den grafischen Vergleich der Leukozytenkonzentrationen in Thrombozytenkonzentraten, die mit der Nageotte-Kammer gezählt bzw. mit dem Blutbildautomaten Abbott CD 3500 gemessen wurden.

Der Blutbildautomat zeigt bereits eine unzureichende Genauigkeit bei Leukozytenkonzentrationen unter 50 - 80 pro Mikroliter Plättchenkonzentrat, was auch durch den sehr schlechten Korrelationskoeffizienten von 0,546 zum Ausdruck kommt.

Nach KRETSCHMER [33] sind Blutbildautomaten für die Bestimmung der Leukozyten-konzentration in Plättchenkonzentraten nicht sensitiv genug, da ihre Meßgenauigkeit abnimmt, wenn die Thrombozytenkonzentration unter $5 \times 10^8$/l bzw. über $700 \times 10^9$/l liegt.

Diese untere Grenze wird in Thrombozytenkonzentraten überschritten und der automatische Zellzähler kann nicht mehr zwischen den oft vorliegenden Plättchenaggregaten und Leukozyten unterscheiden. Deshalb werden zu hohe Leukozytenkonzentrationen gemessen [33].

ZINGSEM et al. [92] verglichen Messungen der Leukozytenkontaminationen in Thrombozyten-konzentraten am automatischen Zellzähler Sysmex 180, der Neubauer-Zählkammer und der Nageotte-Zählkammer (allerdings hier mit einem Volumen von 10 Mikroliter).

Aus den Ergebnissen des automatischen Zellzählers ergaben sich ungefähr 100fach höhere Leukozytenkonzentrationen als in der Nageotte-Kammer.

ZINGSEM et al. [92] schlossen daraus, daß Zellzähler nicht relevant sind für Messungen der Leukozytenkonzentrationen in Plättchenkonzentraten.

Früher enthielten leukozytenarme Blutprodukte 500 -1500 Leukozyten pro Mikroliter [92]. Diese Zellkonzentrationen konnten ausgesprochen einfach mit Blutbildautomaten, deren untere Meßgrenze bei etwa 100 Leukozyten pro Mikroliter Blut liegt, gemessen werden [4, 86, 87].

Mit der Entwicklung effizienter Verfahren der Leukozytendepletion in den letzten Jahren wurde der Gehalt kontaminierender Leukozyten in Blutprodukten immer geringer und die Nachweisbarkeit in der Routine schwieriger.

Die Leukozytenkontamination oberhalb der für eine Alloimmunisierung der Empfänger im HLA-System angenommenen Grenze beträgt $1 \times 10^6$ pro Plättchenkonzentrat, was dem cill-Wert, d.h. der "critical immunological load of leucocytes" entspricht [43] . Wird von einem cill-Wert von etwa $10^6$ Leukozyten pro Transfusionseinheit aus-gegangen, entspricht das in etwa der geringen Kontaminationsrate von 3 bis 5 Leukozyten pro Mikroliter Plättchenkonzentrat.

Der neuartige Zellzähler Abbott CD 3500 gestattet zwei Möglichkeiten der Vollblutentnahme, die Probenentnahme aus offenen bzw. aus geschlossenen Probenröhrchen. Für die vorliegende Arbeit wurden offene Probenröhrchen benutzt, wobei das Ansaugvolumen 130 Mikroliter ± 5% beträgt. Entsprechend der Gerätebeschreibung teilt ein Scherventil die angesaugte Probe in drei Teile:

20 Mikroliter der Probe für die Bestimmung der Leukozytenkonzentration über das Prinzip der Widerstandsmessung, 32 Mikroliter der Probe für die Analyse der Leukozytenkonzentration mittels optischer Zählung und 0,64 Mikroliter der Probe für die Bestimmung von Erythrozyten und Blutplättchen.

Die 20-Mikroliter-Probe für die Bestimmung der Leukozytenkonzentration im Widerstandskanal werden bei einer Verdünnung von 1 : 301 auf 0,066 Mikroliter der ursprünglichen Probe verdünnt. Für die Messung der Leukozytenkonzentration im optischen Kanal, d.h. mittels Laserlichtstreuung, wird die 32 - Mikroliter - Probe 1 : 51 verdünnt.
Aus diesem Grund bleiben für die eigentliche Messung nur 0,63 Mikroliter Probe übrig. Bei Leukozytenkonzentrationen im Bereich des cill-Wertes sind dann bei dieser Verdünnung und diesem geringen Probevolumen nur noch 1-2 Leukozyten pro Probe zu erwarten.

Der neuartige Zellzähler Abbott CD 3500 besitzt zwar mit seinem Meßbereich von 50 bis 80 Leukozyten pro Mikroliter eine bessere Präzision als ältere Blutbildautomaten, ist aber für die vorliegende Untersuchung der Analyse geringster Leukozytenkonzentrationen auf der Ebene des cill-Wertes unzureichend.
Hauptgrund für die Ungenauigkeit dieses Blutbildautomaten ist das zu geringe Meßvolumen.

Das Standardverfahren zur Quantifizierung von niedrigen Leukozytenkonzentrationen ist die mikroskopische Zählung dieser Zellen in der modifizierten Nageotte-Kammer. Es handelt sich dabei um eine Zählkammer mit einem größeren Volumen von 50 Mikrolitern [39, 40, 50].

Abbildung 9 (siehe Ergebnisteil) zeigt den grafischen Vergleich der Leukozytenkontaminationen, die mit Hilfe der Nageotte-Kammer und der FACScan-Methode gemessen wurden.

Es fand sich eine hohe Übereinstimmung beider Methoden, repräsentiert durch den hohen Korrelationskoeffizienten von 0,930. Die Abbildung veranschaulicht allerdings auch, daß bei Leukozytenkonzentrationen von weniger als 10 pro Mikroliter Plättchenkonzentrat die Messung am FACScan niedrigere Werte als die Nageotte-Kammerzählung ermittelte.

Bei konstanter Trenngrenzenposition beträgt die Leukozytenkontamination 4,9 ± 6,3 x $10^6$ pro Thrombozytenkonzentrat (FACScan). Im Vergleich dazu ist die Leukozytenkontamination bei periodischer Trenngrenzeneinstellung mit Werten von 1,2 +/- 5,7 x $10^6$ pro Plättchenkonzentrat signifikant niedriger.

Dabei ist zu erwähnen, daß sich die Spenderausgangswerte bezüglich der Leukozyten-konzentration im Spenderblut nicht signifikant unterschieden (6,2 +/- 1,7 x $10^9$/l für die konstante Trenngrenze vs. 6,0 ± 1,6 x $10^9$/l für die periodische Trenngrenzenposition).

Auch die Ergebnisse der Nageotte-Kammerzählung ergaben signifikant niedrigere Leukozytenkontaminationen in den Plättchenkonzentraten bei den Thrombozytapheresen mit periodischer Trenngrenzeneinstellung.

Es wurden für die konstante Trenngrenzenposition 4,9 ± 5,6 x $10^6$ Leukozyten pro Transfusionseinheit bzw. bei periodischer Trenngrenze 2,1 ± 3,9 x $10^6$ Leukozyten pro Transfusionseinheit gezählt.

Tabelle 9 faßt noch einmal die Leukozytenkontaminationen in den Thrombozytapheresekonzentraten (Nageotte-Kammer und FACS) für beide Trenngrenzenpositionen zusammen.

Tabelle 9: Leukozytenkontaminationen (WBC) in den Thrombozytapheresekonzentraten (Nageotte-Kammer und FACScan) für die konstante und periodische Trenngrenzenposition

| Trenngrenzenposition | WBC x $10^6$/TE (Nageotte) | WBC x $10^6$/TE (FACScan) |
|---|---|---|
| konstant | 4,9 | 4,9 |
| periodisch | 2,1 | 1,2 |

Bemerkenswert ist, daß sowohl mit der Nageotte-Kammer als auch mit Hilfe der Durchflußzytometrie identische Werte für die Leukozytenkontamination bei konstanter Trenngrenzeneinstellung (4,9 ± 5,6 x $10^6$ Leukozyten pro Thrombozytenkonzentrat) ermittelt wurde. D.h., im Bereich von 10 Leukozyten pro Mikroliter reicht die Präzision der Nageotte-Kammer an die der durchflußzytometrischen Methode durchaus heran.

Dieses Ergebnis entspricht den Arbeiten von BODENSTEINER [4] wie auch MASSE et al. [40]. Beide Autoren betonten aber auch, daß mit Hilfe von Zählkammern Leukozytenkonzentrationen unter 10 pro Mikroliter Plättchenkonzentrat nicht präzise genug zu erfassen sind.

Standardisierte Methoden für die Leukozytenzählung in der Nageotte-Kammer wurden von MASSE et al. [40], von LUTZ und DZIK [39] und MOROFF et al. [50] entwickelt.

Die Zellzählung ist nicht nur zeitaufwendig und schwierig durchzuführen. Mit einem Variationskoeffizienten von 39% bei Leukozytenkontaminationen unter 2 pro Mikroliter [39] bzw. einem Variationskoeffizienten von 50% bei Leukozytenkontaminationen zwischen 0,1 und 1 pro Mikroliter (allerdings in Erythrozytenkonzentraten) - in der Arbeit von REBULLA und DZIK [66] - weisen sie nur eine geringe Präzision auf.

SADOFF et al. [69], TAKAHASHI et al. [76], KAO und SCORNIK [30] sowie KAO et al. [29] entwickelten verschiedene Methoden für eine mögliche Vereinfachung der Leukozytenzählung im Plättchenkonzentrat in der Zählkammer. MASSE et al. [40] haben verschiedene Techniken zur Messung sehr niedriger Leukozytenkonzentrationen in gefilterten Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten mit Hilfe der Nageotte-Kammer verglichen. MASSE et al. [40] konnten schlußfolgern, daß in dem Konzentrationsbereich von 10 bis 500 Leukozyten pro Mikroliter Konzentrat die Nageotte-Kammer eine gute Linearität zeigte [40]. Das untere Limit einer exakten Präzision lag bei 2 Leukozyten pro Mikroliter mit einem Variationskoeffizienten von 25%, allerdings mit noch aufwendigeren Schritten der Probeneinengung und zusätzlicher Zentrifugation des Konzentrats.

In der vorliegenden Untersuchung wurde in Anlehnung an die Arbeit von MOROFF et al. [50] das Plättchenkonzentrat mit Essigsäure verdünnt und ohne vorherige Zentrifugation der Probe wurde die Zählkammer präpariert. Ein weiteres Problem liegt darin, daß die Kammerzählung eine ausgesprochen subjektive Methode darstellt. Die exakte Diskriminierung der Leukozyten setzt die lange Erfahrung der zählenden Person bezüglich der Zählkammern voraus. Den Beweis dafür bieten in der vorliegenden Arbeit die Abbildungen 10 und 11.

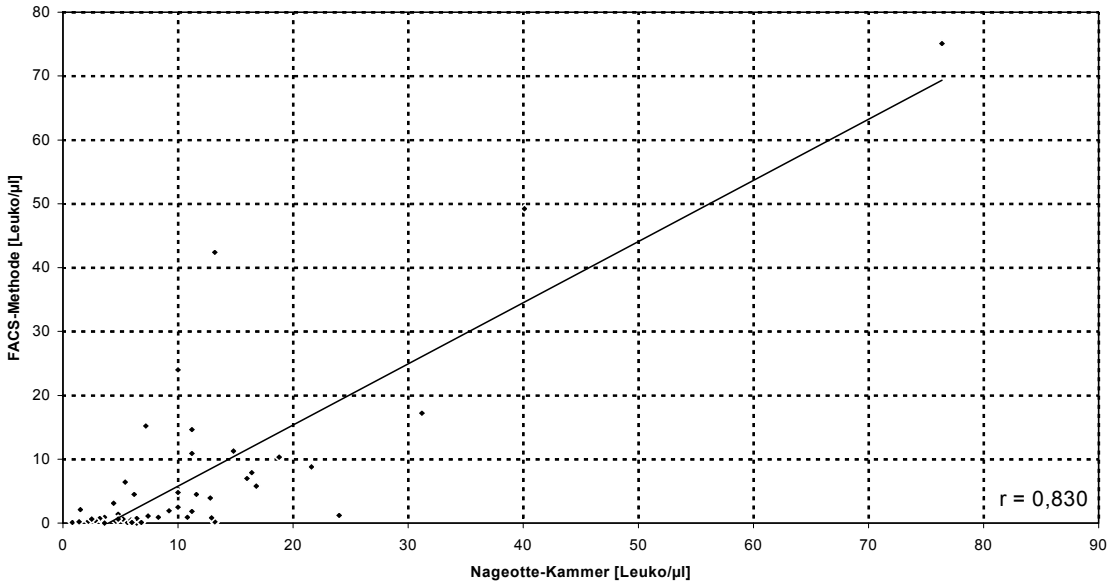


Abbildung 10: Vergleich von Nageotte-Kammer und FACScan-Methode: Messung 1 bis 50

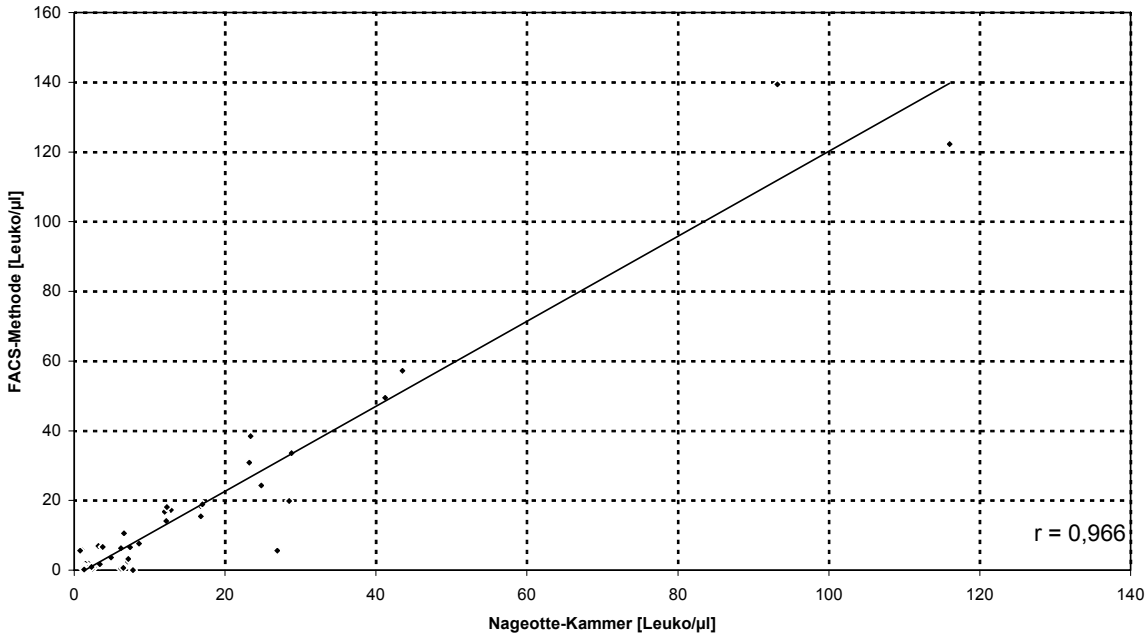


Abbildung 11: Vergleich von Nageotte-Kammer und FACScan-Methode: Messung 51 bis 100

Bei den ersten 50 Messungen (Abb.10) besteht mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,83 eine geringere Übereinstimmung der beiden Meßmethoden Nageotte und FACScan als bei den Messungen 51 bis 100 (Abb.11), wo ein Korrelationskoeffizient von 0,966 ermittelt wurde (hier ohne Beachtung der beiden Trenngrenzenpositionen). Dieses Ergebnis bezieht sich eindeutig auf die durch die Einarbeitung in das Gebiet der Kammerzählung erworbenen Fähigkeiten.

Zusammenfassend kann mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, daß die Nageotte-Kammerzählung bis zu einem Konzentrationsbereich von 10 Leukozyten pro Mikroliter Plättchenkonzentrat eine gute Linearität besitzt [40]. Im für diese Arbeit relevanten Meßbereich von bis zu 1 Leukozyten pro Mikroliter Plättchenkonzentrat resultiert aus den vorliegenden Meßergebnissen, daß die Präzision der Durchflußzytometrie derjenigen der Nageotte-Kammer überlegen ist (Abb. 10 und 11).

Das entspricht den Ergebnissen von RADTKE et al. [64], die mit der Methode der Durchflußzytometrie einen Variationskoeffizienten von 20% bei unter 1 Leukozyten pro Mikroliter Thrombozytenkonzentrat eine deutlich bessere Präzision erzielten, als mit der mikroskopischen Zählung mit Hilfe der Nageotte-Kammer [39, 66, 40].

Der entscheidende Grund für die bessere Präzision der Durchflußzytometrie ist das größere Probenvolumen, das zur Zellanalyse zur Verfügung steht.

In der vorliegenden Arbeit betrug das Probenvolumen für die Zählung in der modifizierten Nageotte-Kammer jeweils 10 Mikroliter.

Für die Messung am Durchflußzytometer standen bei einer Messung von drei Minuten und einem Probenfluß von etwa 60 Mikrolitern pro Minute jeweils 15 Mikroliter Probe zur Analyse. D.h., es stand das 1,5 fache des Probenvolumens bei der durchflußzytometrischen Messung im Vergleich zum analysierten Probenvolumen der Nageotte-Kammer zur Verfügung, womit weitestgehend die bessere Präzision des FACScan zu erklären ist.

Der Gegenüberstellung der beiden Trenngrenzenpositionen am Blutzellseparator FRESENIUS AS 104 werden die als präziser geltenden Meßergebnisse der durchflußzytometrischen Methode zugrunde gelegt.

## 2. Vergleich der Apherese-Methoden

Der Zellseparator AS 104 ist ein modernes Gerät zur Gewinnung von Plasma und Blutzellen. Die Trenngrenzeneinstellung bei der Thrombozytapherese regelt die Grenze zwischen den Erythrozyten und Leukozyten einerseits und dem plättchenreichen Plasma andererseits.
Die Einstellung der Trenngrenzenposition am Blutzellseparator FRESENIUS AS 104 beeinflußt nicht nur entscheidend die Anzahl kontaminierender Leukozyten im Plättchenkonzentrat, sondern auch die Effektivitätsparameter Plättchenausbeute und Separationseffizienz [5, 31, 33, 35, 46, 58, 81], die im folgenden für den Vergleich der beiden Trenngrenzenpositionen mit heran gezogen werden.

Bei Anwendung der konstanten Trenngrenze lag der Absolutertrag an Thrombozyten im Mittel bei $3,6 \times 10^{11}$ pro Plättchenkonzentrat, im Separationsverfahren mit periodischer Trenngrenze bei $3,3 \times 10^{11}$ Thrombozyten pro Konzentrat.

Es handelt sich um einen signifikanten Unterschied zugunsten der konstanten Trenngrenze (t-Test: $p = 0,017$), bei vergleichbaren Ausgangswerten der Spender bezüglich ihrer Thrombozyten-konzentration im Blut ($251 \times 10^{9}$ Thrombozyten pro Liter Spenderblut für die konstante Trenngrenze vs. $243 \times 10^{9}$ Thrombozyten pro Liter Blut bei Anwendung der periodischen Trenngrenzenposition; U-Test: $p = 0,171$).

Der nach den neuen „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten“ [2] geforderte Gehalt von über $2 \times 10^{11}$ Thrombozyten pro Plättchenkonzentrat wurde in beiden Separationsverfahren eingehalten.

Bei Anwendung der konstanten Trenngrenze betrug das Minimum der Plättchenausbeute 2,4 x $10^{11}$ pro Thrombozytenkonzentrat und das Maximum des Thrombozytenertrags 7,3 x $10^{11}$ pro Plättchenkonzentrat.

Im Separationsverfahren mit periodischer Trenngrenzenposition lag das Minimum des Absolutertrags an Thrombozyten bei 2,0 x $10^{11}$ Thrombozyten pro Plättchenkonzentrat und das Maximum bei 5,6 x $10^{11}$ Plättchen pro Thrombozytenkonzentrat. Trotz der signifikanten Unterschiede des Plättchengehaltes in den Thrombozytenkonzentraten wurde der geforderte Gehalt an Thrombozyten je Plättchenkonzentrat in beiden Separationsverfahren eingehalten.

Der Effektivitätsparameter Separationseffizienz der Thrombozytapherese errechnet sich aus dem Verhältnis von Plättchenausbeute zum Produkt von Separationsvolumen und mittlerer Thrombozytenkonzentration im Spenderblut vor und nach der Apherese.

Für das Separationsverfahren mit konstanter Trenngrenze wurde eine Separationseffizienz von 48%, für die periodische Trenngrenzenposition von 43,4% ermittelt. Der statistische Vergleich zeigt, daß beim Separationsverfahren mit periodischer Trenngrenze eine signifikant erniedrigte Separationseffizienz (t-Test: $p = 0,005$) erzielt wird.

Durch den signifikanten Unterschied des Parameters Plättchenausbeute zugunsten des Separationsverfahrens mit konstanter Trenngrenze erklärt sich auch die signifikant höhere Separationseffizienz bei konstanter Trenngrenzenposition.

Werden die jeweiligen Separationseffizienzen für die einzelnen Thrombozytapheresen detailliert betrachtet, ergibt sich bei konstanter Trenngrenze eine minimale Separationseffizienz von 35,3% und eine maximale Separationseffizienz von 81,7%. Allerdings scheint die maximale Separationseffizienz von 81,7% sehr hoch, was eventuell eine Ungenauigkeit in der Bestimmung der Spenderwerte vermuten lassen dürfte.

Im Separationsverfahren mit periodischer Trenngrenze liegt die kleinste Separationseffizienz bei 26,8% und die größte bei 68,2%, also deutlich geringer im Vergleich zur konstanten Trenngrenzenposition.

Weder das Separationsvolumen noch die mittlere Plättchenkonzentration im Spenderblut unterscheiden sich in den beiden Separationssystemen jeweils signifikant voneinander und beeinflussen daher die Berechnung der Separationseffizienzen kaum.

Für das Unterschreiten der für eine Alloimmunisierung der Empfänger im HLA-System kritischen Grenze (cill-Wertes von 1 bis 5 x $10^{6}$ Leukozyten pro Plättchenkonzentrat) ergibt sich aus den mit Hilfe der durchflusszytometrischen Methode im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Resultate folgendes: Die Ergebnisse der Thrombozytapherese mit konstanter Trenngrenzenposition unterscheiden sich in deutlich von denen mit periodischer Trenngrenzeneinstellung.

Bei konstanter Trenngrenzenposition lag das durch den FACScan ermittelte Meßergebnis nur neun Mal unter 1 x $10^6$ Leukozyten pro Thrombozytenkonzentrat, während bei 17 Messungen die Leukozytenkonzentration den Wert von 5 x $10^6$ pro Plättchenkonzentrat überschritt, neben einem Ausreißer mit deutlich höherer Kontamination.

Bei periodischer Trenngrenzenposition lag die mittels FACScan gemessene Leukozyten-kontamination bei 46 von 50 Proben unter dem angestrebten Wert von 1 x $10^6$ pro Thrombozytenkonzentrat, lediglich bei zwei Thrombozytapheresen überschritten die Leukozytenkontaminationen den Wert von 5 x $10^6$ pro Plättchenkonzentrat.

Für die beiden Ausreißer gilt folgendes: Ein Wert liegt mit 17,2 Leukozyten pro Mikroliter Thrombozytenkonzentrat knapp über der oberen Grenze des cill-Wertes von 5 x $10^6$ Leukozyten pro Plättchenkonzentrat.

Der zweite Wert ist mit 139,4 Leukozyten pro Mikroliter Thrombozytenkonzentrat (40,2 x $10^6$ Leukozyten pro Plättchenkonzentrat) extrem hoch und fällt völlig aus dem Rahmen der anderen, bei periodischer Trenngrenze gemessenen Leukozytenkonzentrationen.

Für die Analyse der Ausreißer wurden erstens eventuelle Fehlermöglichkeiten bei der Bestimmung der Leukozytenkontamination in den Thrombozytapheresekonzentraten und zweitens die Spenderwerte untersucht.

Die sehr hohe und völlig aus dem Rahmen fallende Leukozytenkontamination im Plättchenkonzentrat nach Thrombozytapherese mit periodischer Trenngrenzenposition wurde im FACScan mit 139,4 Leukozyten pro Mikroliter Thrombozytenkonzentrat ermittelt. Parallel dazu wurden in der modifizierten Nageotte-Kammer 93,2 Leukozyten pro Mikroliter Plättchenkonzentrat gezählt.

Der extrem hohe Ausreißer bei periodischer Trenngrenzenposition wurde sofort nach Erhalt des Ergebnisses überprüft, in dem die Messungen am Durchflußzytometer bzw. die Zählung der entsprechenden Probe in der Nageotte-Kammer mehrfach wiederholt wurde. Das Ergebnis blieb unverändert.

Als möglicher Fehler käme auch der Zeitpunkt der Messung in Betracht. Allerdings fanden die durchflußzytometrischen Messungen sofort nach Inkubation der Proben mit beads und Antikörpern bzw. die Zählung der Leukozyten in der Nageotte-Kammer unmittelbar nach Sedimentation der Zellen in der Zählkammer statt.

Um Überlagerungen der Leukozyten oder eine ungleichmäßige Verteilung der Leukozyten (bei höheren Zellzahlen) auszuschließen, hätte eine stärkere Verdünnung für die Probenanalyse gewählt werden können.

Diese Möglichkeit wurde für die vorliegende Arbeit nicht genutzt. Es gilt auch zu bedenken, daß mit steigender Verdünnung sich auch der methodische Fehler vergrößert hätte.

Prinzipiell zeigten sich am Blutzellseparator FRESENIUS AS 104 während der Apheresen mit periodischer und konstanter Trenngrenzenposition keine wesentlichen auf eine Fehlfunktion hinweisenden Alarmmeldungen, so daß der hohe Ausreißer mit der Apherese an sich nicht erklärbar wird.

Auf der Ebene der Spender ließ sich nur ermitteln, daß für einige Thrombozytapheresekonzentrate mit hoher Leukozytenkontamination (konstante Trenngrenzenposition) bereits die entsprechenden Leukozytenwerte im Spenderblut an der oberen Grenze (10,1 bis 10,5 x $10^9$ pro Liter Blut) [74] der Bedingungen für Zytapherese-Spender lagen.

ZEILER et al. [91] berichteten allerdings in ihrer Studie, daß keinerlei Korrelation zwischen dem Leukozytenwert im Spenderblut und der Leukozytenkonzentration im Thrombozytenkonzentrat nachgewiesen werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit gibt es weiterhin einige Thrombozytapheresekonzentrate (bei konstanter Trenngrenzenposition) mit hoher Leukozytenkontamination, die mit einer im Vergleich relativ kurzen Apheresedauer von 52 Minuten bis 60 Minuten hergestellt wurden. Während ZEILER et al. [91] den Zusammenhang zwischen einer Steigerung der Separationsgeschwindigkeit und einer damit verbundenen Erhöhung der Leukozytenkontamination in den Thrombozytenkonzentraten verneinen, sehen PACHMANN et al. [59] sehr wohl einen Zusammenhang zwischen einer längeren Apheresedauer und einer Senkung der Leukozytenkontamination in den Plättchenkonzentraten.

Für den bei periodischer Trenngrenze im FACScan ermittelten extrem hohen Leukozytenwert von 139,4 pro Mikroliter Thrombozytenkonzentrat läßt sich nur die Besonderheit ermitteln, daß der Hämatokrit-Wert im entsprechenden Spenderblut mit 38% an der unteren Grenze der Kriterien zur Spendertauglichkeit lag [74].

ZEILER et al. [91] schlußfolgerten in ihrer Studie allerdings, daß der Spender-Hämatokritwert keinerlei Einfluß auf die Separationsqualität des Plättchenkonzentrates hat.

Auch in der vorliegenden Arbeit ließ sich kein Zusammenhang zwischen hohen Leukozytenkontaminationen in den Thrombozytapheresekonzentraten und einem eher niedrigen Hämatokrit-Wert des Spenders nachweisen.

Zusammenfassend bleibt es unklar, warum nach Anwendung der periodischen Trenngrenze ein Wert der Leukozytenkontamination im Thrombozytenkonzentrat die obere Grenze des cill-Wertes so weit überschreitet.

Tabelle 10 zeigt zusammenfassend die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

Tabelle 10: Auswirkungen der Trenngrenzenposition(TG) auf die Plättchenausbeute (PLT), die Separationseffizienz (SE) und die Leukozytenkontamination (WBC) in den Thrombozytapheresekonzentraten (TE)

| | Konstante TG | Periodische TG |
|---|---|---|
| PLT x $10^{11}$/TE | 3,6 | 3,3 |
| SE in % | 48,0 | 43,3 |
| WBC x $10^{6}$/TE (FACScan) | 4,9 | 1,2 |

Es wird deutlich, daß die Trenngrenzenposition während der Thrombozytapherese am Zellseparator FRESENIUS AS 104 eine entscheidende Bedeutung für die Anzahl kontaminierender Leukozyten in den Thrombozytenkonzentraten sowie für die Größe der Plättchenausbeute und der Separationseffizienz besitzt.

Mit periodischer Trenngrenzenposition konnten signifikant niedrigere Leukozytenkontaminationen im Plättchenkonzentrat (1,2 x $10^{6}$ Leukozyten pro Thrombozytenkonzentrat) als mit konstanter Trenngrenzeneinstellung (4,9 x $10^{6}$ pro Plättchenkonzentrat) erzielt werden (Ergebnisse am FACScan).

Dagegen waren bei konstanter Trenngrenzenposition Plättchenausbeute und Separationseffizienz signifikant höher (3,6 x $10^{11}$ pro Thrombozytenkonzentrat und 48% Separationseffizienz vs. 3,3 x $10^{11}$ pro Plättchenkonzentrat und 43,3% Separationseffizienz bei periodischer Trenngrenzenposition).

Auch MOOG [45] untersuchte den Einfluß der Trenngrenzenposition während der Thrombozytapherese mit dem Zellseparator AS 104. In dieser Studie von MOOG [45] wurden anhand von sieben Protokollen verschiedene Trenngrenzeneinstellungen bei Thrombozytapheresen mit dem Zellseparator AS 104 bezüglich ihrer Zellkontamination, Thrombozytenausbeute und Extraktionseffizienzen untersucht.
Fünf von sieben Protokollen wurden mit verschiedenen, aber konstanten Trenngrenzen, zwei Protokolle mit periodischer Trenngrenzenposition (6 : 2 / >8 : 0 bzw. 5 : 3 / 8 : 0) durchgeführt.

Bei peripheren Trenngrenzenpositionen (4 : 4 bzw. 5 : 3) wurden geringe Extraktionseffizienzen (28,8% bzw. 32,6%) und geringe Leukozytenkontaminationen (0,9 ± 1,9 x $10^6$ WBC pro Konzentrat bzw. 0,3 ± 0,9 x $10^6$ pro Plättchenkonzentrat) erzielt.
In der Arbeit von MOOG [45] stieg die Extraktionseffizienz auf 42,7% bei weniger peripherer Lage der Trenngrenzenposition (> 8 : 0), allerdings nahm die Leukozytenkontamination beträchtlich zu (117,9 ± 97,6 WBC pro Konzentrat).
In der beschriebenen Studie [45] waren die Leukozytenkontaminationen in den Thrombozytenkonzentraten bei periodischer Trenngrenzenposition am Zellseparator signifikant niedriger als bei konstanter Trenngrenze.
Bei periodischer Trenngrenzenposition von 6 : 2 / > 8 : 0 lagen sie im Mittel bei 0,3 ± 0,9 x $10^6$ pro Thrombozytenkonzentrat, bei periodischer Trenngrenzeneinstellung von 5 : 3 / 8 : 0 sogar bei 0 x $10^6$ Leukozyten pro Plättchenkonzentrat. Das ist ein Ergebnis, das deutlich unter der Leukozytenkontamination bei periodischer Trenngrenzenposition in der vorliegenden Arbeit liegt (1,2 ± 5,7 x $10^6$ Leukozyten pro Thrombozytenkonzentrat). Dabei ist anzumerken, daß in der Arbeit von MOOG [45] die Leukozytenkontaminationen in den Thrombozytenkonzentraten durch mikroskopisches Auszählen in der Neubauer-Kammer ermittelt wurden.

Da sich die Arbeit von MOOG [45] von der vorliegenden Untersuchung bezüglich Softwareversion, periodischer Trenngrenzenposition und Zählkammer unterscheidet, ist der exakte Vergleich beider Arbeiten nur schwer möglich.

Allerdings wird deutlich, daß die Trenngrenzenposition am Zellseparator Fresenius AS 104 einen Einfluß auf Leukozytenkontamination im Thrombozytenkonzentrat, Separationseffizienz und Plättchenausbeute besitzt.

Bei periodischer Trenngrenze werden die niedrigsten kontaminierenden Leukozytenkonzentrationen erreicht, wobei Separationseffizienz und Plättchenausbeute im Vergleich zu konstanter Trenngrenzenposition niedriger sind. Die sehr geringe und unterhalb des cill-Wertes liegende Anzahl kontaminierender Leukozyten bei periodischer Trenngrenzenposition in der Arbeit von MOOG [45] geht allerdings auf Kosten einer reduzierten Plättchenausbeute von im Mittel 3,0 ± 0,7 x $10^{11}$ pro Thrombozytenkonzentrat (vorliegende Arbeit: 3,3 ± 0,7 x $10^{11}$ Plättchen pro Konzentrat) und den bereits besprochenen, im Vergleich geringen, Separationseffizienzen von 36% bzw. 39%.

MOOG et al. [48] veröffentlichten auch ein Abstract zum Einfluß der Trenngrenzenposition am Blutzellseparator Fresenius AS 104 auf Separationseffizienz und Zellkontamination in Thrombozytenkonzentraten. Unter Standardbedingungen (Blutfluß 50ml/min; 3500 ml Blutvolumen; 1900 U/min) wurden drei verschiedene Separationsprotokolle mit konstanter Trenngrenze und ein Separationsprotokoll mit alternierender Trenngrenzenposition durchgeführt. Die genaue Lage der alternierenden Trenngrenze wurde von den Autoren nicht angegeben.

Die Autoren [48] konnten die niedrigsten Leukozytenkontaminationen ebenfalls in Plättchenkonzentraten bei alternierender (und nicht genannter) Trenngrenzenposition am Zellseparator Fresenius AS 104 erreichen. Die Leukozytenkontamination lag bei 0,3 x $10^6$ pro Plättchenkonzentrat.

Im Vergleich zu den Protokollen mit der konstanten Trenngrenzenposition von 6 : 2 bzw. 7 : 1 reduzierte sich die Leukozytenkontamination bei alternierender Trenngrenze um den Faktor > 10.

In dieser Studie von MOOG et al. [48] ist es dabei gelungen, bei alternierender Trenngrenzenposition Separationseffizienzen zu erreichen, die auf der Höhe derer mit konstanter Trenngrenzenposition liegen (37,8% bzw. 39,4% bei konstanter Trenngrenzenposition vs. 39,1% bei periodischer Trenngrenzenposition).

Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit (48,8% bei konstanter und 43,3% bei periodischer Trenngrenzenposition) liegen die Separationseffizienzen in der Studie von MOOG et al. [48] deutlich niedriger.

Der Vergleich von Separationseffizienzen ist allerdings problematisch. So geht aus einer Studie von KAUTZ et al. [32] hervor, daß sich auch die Verwendung unterschiedlicher Software auf die Separationseffizienz auswirken kann (bei MOOG [45] Software-Version 4.416 vs. 4.7. für die vorliegende Arbeit).

KRETSCHMER und ROSSA [35] zeigten, daß die Separationseffizienz auch von der Zentrifugengeschwindigkeit abhängig ist. Sie bezeichneten die Zentrifugengeschwindigkeit als die wichtigste Variable bei Optimierung der Thrombozytapherese mit dem Zellseparator AS 104. KRETSCHMER und ROSSA [35] beobachteten bei einer Zentrifugengeschwindigkeit von 1900 UpM und einem Blutfluß von 50 ml/min Extraktionseffizienzen von ca. 60%, bei einer Thrombozytenausbeute von 3,5 bis 3,8 x $10^{11}$ Thrombozyten pro Plättchenkonzentrat und Leukozytenkontaminationen um 1 x $10^7$ pro Thrombozytenkonzentrat.

PACHMANN et al. [59] hingegen sehen den Blutfluß als eigentliche entscheidende Größe für die Separationseffizienz.

Schließlich zeigt die Studie von KRETSCHMER und ROSSA [35], daß auch interapparative Unterschiede auftreten können, selbst bei Verwendung von Thrombozytapheresegeräten identischen Typs und gleichen Separationsprotokollen.

Für die vorliegende Arbeit ist zu berücksichtigen, daß hierbei der Einfluß der Trenngrenzenpositionen auf Leukozytenkontamination in Plättchenkonzentraten, Plättchenausbeute und Separationseffizienz untersucht wurde.

HARTH et al. [25] haben am Blutzellseparator Fresenius AS 104 insgesamt 25 Thrombozytapheresen mit periodischer Trenngrenzenposition (nicht genauer bezeichnet) durchgeführt und ermittelten Leukozytenkontaminationen zwischen 1 x $10^6$ und 5 x $10^6$ pro Thrombozytenkonzentrat in der modifizierten Nageotte-Kammer.

Dieses Ergebnis, das im Rahmen des cill-Wertes liegt, ist - abgesehen von dem einen Ausreißer bei periodischer Trenngrenzenposition - vergleichbar mit den in der vorliegenden Arbeit gewonnen.

ULRICH und KALB [78] untersuchten Einflüsse von periodischem Wechsel der Trenngrenzen-position nicht nur während der Sammelphase, sondern auch während der Transferphase (Sammelphase: 3 : 5 / 5 : 3 ; Transferphase: 5 : 3 / 6 : 2).

Mit diesem Protokoll konnten äußerst geringe Leukozytenkontaminationen von 0,09 ± 0,15 x $10^6$ pro Plättchenkonzentrat, eine sehr hohe Separationseffizienz von 48,9 ± 4,6% und eine ansehnliche Plättchenausbeute von 5,31 ± 0,45 x $10^{11}$ pro Konzentrat erzielt werden.

Aus dieser Arbeit wird deutlich, daß mit Hilfe von Veränderungen der Trenngrenzenposition nicht nur minimale Leukozytenkontaminationen erreicht werden können, sondern daß auch bei Minimierung der Leukozytenkontamination in Plättchenkonzentraten unterhalb des cill-Wertes nicht mehr auf gleichzeitig hohen Plättchengehalt im Konzentrat und eine hohe Separationseffizienz verzichtet werden muß.

ULRICH und KALB [79] veröffentlichten ein weiteres Abstract über ihre Untersuchungen zur Beeinflussung der Sammelphase bei Thrombozytapherese mit periodischer Trenngrenzenposition (4 : 4 / 6 : 2) am Blutzellseparator FRESENIUS AS 104. Sie entwickelten eine spezielle Software, um den Einfluß einer verkürzten wie auch verlängerten Sammelphase auf Plättchenertrag und Leukozytenkontamination in Thrombozytapheresekonzentraten zu ermitteln.

ZINGSEM et al. [93] arbeiteten mit dem neuen Zellseparator Fresenius AS TEC 204, der seit 1995 im Einsatz ist. Das Gerät, daß mit dem vom Zellseparator AS 104 bekannten Sets und einer auf der Softwareversion 4.7. (wie in der vorliegenden Arbeit) vorliegenden Steuerung arbeitet, wurde von ZINGSEM et al. [93] mit verschiedenen Trenngrenzeneinstellungen erprobt. Die niedrigste mediane Leukozytenkontamination konnte unter Nutzung der variablen Trenngrenze erreicht werden (0,1 x $10^6$ Leukozyten pro Plättchenkonzentrat). Eine sogenannte Sammeleffektivität im Median von 49% wurde von den Autoren angegeben.

Auch MOOG und MÜLLER kamen in ihrer Studie [49] zu dem Ergebnis, daß sich mit dem Zellseparator AS TEC 204 bei Verwendung des Programms mit alternierender Trenngrenze (nicht genau bezeichnet) die Leukozytenkontamination in den Thrombozytenkonzentraten deutlich reduzieren läßt (0,03 ± 0 x $10^6$ Leukozyten pro Plättchenkonzentrat).

In den acht Separationen mit dem Programm mit alternierender Trenngrenzenposition konnte eine Plättchenausbeute von 3,2 ± 0,7 x $10^{11}$ pro Konzentrat erreicht werden, bei einer Separationseffizienz von 40,4% ± 6,0%.

Werden die Thrombozytenkonzentrate zum Zweck der Leukozytendepletion nach ihrer Herstellung gefiltert, reduzieren Leukozytenfilter der dritten Generation den Leukozytengehalt in Plättchenkonzentraten um zwei bis vier log-Stufen (> 99 - 99,99 % der Leukozyten werden entfernt). Der Thrombozytenverlust nach Filterung beträgt etwa 5 bis 20% [83, 28].

Bei MOOG et al. [47], die einen integrierten Filter für den FRESENIUS-AS-104-Blut-zellseparator testeten, um leukozytendepletierte Thrombozytaphereseepräparate mittels geschlossener Einmalsysteme herstellen zu können, betrug der Thrombozytenverlust nach Filterung auch ungefähr 15%.

Auch ZEILER und KRETSCHMER [90] untersuchten in ihrer Studie den integriertem Leukozyten- bzw. Adhäsionsfilter BIOFIL P plus, Fresenius, für den Zellseparator FRESENIUS AS 104. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß neben einer Leukozytenreduktion durch Filtration von durchschnittlich 98,5%, der Thrombozytenverlust nur 8,5% betrug, also niedriger als vielfach beschrieben wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Modifikation der Thrombozytapherese mit periodischer Trenngrenze der Thrombozytenertrag und die Separationseffizienz um etwa 10% gegenüber dem Standardverfahren mit konstanter Trenngrenze gesenkt. Dieser Thrombozytenverlust relativiert sich allerdings angesichts der Tatsache, daß die notwendige Filterung zur Leukozytendepletion des Standard-Thrombozytaphereseekonzentrats mit konstanter Trenngrenze ebenfalls zu einem Thrombozytenverlust in dieser Größenordnung führt.

Die Einstellung der Trenngrenzenposition bei der Thrombozytapherese mit dem Zellseparator FRESENIUS AS 104 wirkt sich in der Praxis also vor allem auf die Leukozytenkontamination der Thrombozytenkonzentrate und die Separationseffizienz aus.

Sollte sich durch weitere Modifikationen am Zellseparator die Leukozytenkontamination regelmäßig unter 1 x $10^{6}$ pro Transfusionseinheit senken lassen, kann auf eine zusätzliche Leukozytendepletion der Thrombozytenkonzentrate vollständig verzichtet werden.

Am Universitätsklinikum Charité gibt es mittlerweile eine komplette Einführung des Programms mit periodischer Trenngrenzenposition am Zellseparator FRESENIUS AS 104, um die Leukozytenkontamination in den Thrombozytaphereseekonzentraten regelmäßig unter 1 x $10^{6}$ pro Transfusionseinheit zu senken.

# Kapitel V

# Zusammenfassung

Mit dem Ziel einer möglichen regelmäßigen Senkung der Leukozytenkontamination in Thrombozytapheresekonzentraten unter die kritische Grenze für eine Alloimmunisierung mit 1 x $10^6$ Leukozyten pro Transfusionseinheit ("critical immunological load of leukocytes" (cill)) wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Thrombozytaphereseprotokolle des kontinuierlich arbeitenden Zellseparators FRESENIUS AS 104 verglichen. Bei je 50 Thrombozytapheresen wurde das Standardprogramm mit konstanter Trenngrenze bzw. die Programm-Modifikation mit periodischer Trenngrenzenposition eingesetzt. Der Vergleich der beiden Trenngrenzeneinstellungen erfolgte auf der Basis der ermittelten Leukozytenkontaminationen in den Thrombozytapheresekonzentraten sowie den errechneten Qualitätsparametern Plättchenausbeute und Separationseffizienz.

Die Ausgangswerte der Spender unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich Leukozyten- und Thrombozytenkonzentration. Die charakteristischen Thrombozytapherese-Parameter Separationsvolumen, Separationsdauer und Konzentratvolumen weisen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auf.

Hingegen weichen die Effektivitätsparameter beider Thrombozytaphereseverfahren signifikant voneinander ab: Der Thrombozyten-Ertrag ist bei Anwendung der konstanten Trenngrenze im Mittel mit 3,6 x $10^{11}$/TE signifikant höher als bei Anwendung der periodischen Trenngrenze mit 3,3 x $10^{11}$/TE (t-Test:p = 0,017). Dementsprechend sind bei vergleichbaren Mittelwerten für Separationsdauer (63min vs. 64min) und Separationsvolumen (3588 ml vs. 3737 ml) sowohl die Separationsleistung (5,9 x $10^9$/min vs. 5,2 x $10^9$/min; t-Test: p = 0,018), als auch die Separationseffizienz (48,0% vs. 43,3%; t-Test: p = 0,005) signifikant niedriger bei r Anwendung der periodischen Trenngrenzenposition.

Die Bestimmung und damit der Vergleich der Leukozytenkontaminationen in Thrombozytapherese-konzentraten stellt ein bekanntes methodisches Problem dar, da es sich um den niedrigen Konzentrationsbereich von unter 5 Leukozyten pro Mikroliter handelt. Als "Gold-Standard" hat sich die mikroskopische Auszählung der Zellen mit Hilfe der modifizierten Nageotte-Kammer etabliert. Diese Methode ist zeitaufwendig und schwierig durchzuführen und besitzt nur eine geringe Präzision mit einem Variationskoeffizienten um 50 %.

Deshalb kamen in der vorliegenden Arbeit neben der modifizierten Nageotte-Kammer zwei Alternativmethoden zur Anwendung: Zum einen wurde ein neuartiger Blutbildautomat (Abbott CD 3500) verwendet, zum anderen kam eine durchflußzytometrische Methode zum Einsatz, die eine deutlich bessere Präzision mit einem Variationskoeffizienten um 20 % aufweist als die Kammer-Zählung.

Beim Vergleich zwischen Nageotte-Kammer-Zählung und Blutbildautomat zeigt der Blutbildautomat Abbott CD 3500 bei Leukozyten-Konzentrationen unter 50 bis 80 pro Mikroliter eine unzureichende Genauigkeit (r = 0,546). Zwischen Nageotte-Kammer-Zählung und FACS-Methode findet sich hingegen eine gute Korrelation (r = 0,930). Es fällt allerdings auf, daß im unteren Meßbereich unter 10 pro Mikroliter die FACS-Methode im Mittel niedrigere Werte ermittelte als die Nageotte-Kammer. Die Ursache dürfte darin zu suchen sein, daß bei der Kammerzählung die Diskriminierung von Leukozyten teilweise sehr subjektiv ist und die Genauigkeit der Methode von der Erfahrung der zählenden Person abhängt. Dagegen setzt die FACS-Methode lediglich genaues Pipettieren voraus.
In der vorliegenden Arbeit lassen sich diese Erklärungen dadurch belegen, daß die Korrelation zwischen beiden Methoden bei den ersten fünfzig Messungen deutlich schlechter ist als bei den letzten fünfzig Messungen.

Die mit der Durchflußzytometrie ermittelten Leukozytenkonzentrationen sind auch deshalb als präziser anzusehen, da im Vergleich zur Nageotte-Kammer ein größeres Messvolumen analysiert wird.

Die Leukozytenkontamination ist signifikant niedriger bei Anwendung der periodischen Trenngrenze: Je nach angewandter Methode liegt die mittlere Leukozyten-Kontamination bei Anwendung der konstanten Trenngrenze bei 4,9 x $10^6$/TE, bei Anwendung der periodischen Trenngrenze bei 2,1 bzw. 1,2 x $10^6$/TE (U-Test: $p < 0,0001$).

Die mittels der FACS-Methode ermittelten Leukozytenkontaminationen liegen vor allem bei niedrigen Leukozytenkonzentrationen im Mittel unter den mit der Nageotte-Kammer-Zählung ermittelten Werten. Bei Anwendung der konstanten Trenngrenze liegt die Leukozytenkontamination bei sechs (Nageotte-Kammer-Zählung) bzw. neun (FACS-Methode) Thrombozytapheresekonzentraten unter dem cill-Wert, bei Anwendung der periodischen Trenngrenze bei 23 bzw. 46 Konzentraten.

Bei beiden Separationsverfahren findet sich je ein Ausreißer mit deutlich höherer Kontamination.

Basierend auf den Leukozytenkonzentrationen der FACS- Methode zeigt sich, daß die Modifikation des Thrombozytenseparationsverfahrens mit periodischer Verschiebung der Trenngrenze eine signifikante Senkung der Leukozytenkontamination bewirkt. Bei 46 von 50 Thrombozytapheresen lag die Leukozytenkontamination unter dem angestrebten Wert von 1 x $10^6$/TE, lediglich bei einer Thrombozytapherese über 5 x $10^6$/TE. Der Thrombozytenertrag und die Separationseffizienz werden um etwa 10% gegenüber dem Standardverfahren mit konstanter Trenngrenze gesenkt. Dieser Thrombozytenverlust ist jedoch bedeutungslos, da die notwendige Filterung des Standard-Thrombozytapheresekonzentrats zur Leukozytendepletion ebenfalls zu einem Thrombozytenverlust führt, der in derselben Größenordnung liegt.

Im Laufe des letzten Jahres hat sich als Alternative zur Leukozytendepletion mittels Filter die Modifikation des Zellseparators bezüglich periodischer Trenngrenzenpositionen durchgesetzt.

Nach den „neuen Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“ muß dabei ein Restleukozytengehalt von unter $1 \times 10^6$ pro Transfusionseinheit in leukozytendepletierten Apherese-Thrombozytenkonzentraten eingehalten werden.

# KAPITEL VI

# LITERATURVERZEICHNIS

[1] Bekanntmachung des Paul-Ehrlich-Institutes vom 18.09.2000. Zitiert in : Prof. Dr. Dr. H. Kiesewetter: Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaprodukten (Broschüre)

[2] Bekanntmachung über die Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsschutz 2000. 43: 555 – 589. Springer-Verlag 2000

[3] Bekanntmachung über die Zulassung und Registrierung von Arzneimitteln (Aufbereitungsmonographien für den humanmedizinischen Bereich). Bundesanzeiger Nr. 182 vom 27.09.1989.

[4] Bodensteiner, D.C.: A flow cytometric technique to accurately measure post-filtration white blood cell counts. Tranfusion 29, 651-653 (1989)

[5] Borberg, H., Kretschmer, V., Godehardt, E., Sojka, G.: Evaluierung eines neuen, vollautomatischen Blutseparators mit kontinuierlichem Blutdurchfluß. Beitr. Infusionsther. Basel, Karger, vol 28, 177-187 (1991)

[6] Bordin, J.O., Blajchman, M.: Immunosuppressive effects of allogenic blood transfusions: Implications for the patient with a malignancy. Hematol Oncol Clin North Am 9, 205 (1995)

[7] Bowden, R.A.; Cays, M.; Schoch, G., et al: Comparison of filtered blood (FB) to seronegative blood products (SB) for prevention of cytomegalovirus (CMV) infection after marrow tranplant. Blood 82, 204a (1993)

[8] Bracey, A.; Radovancevic, R.; Radovancevic, B., et al: Effect of leucocyte-depleted blood on CMV disease after heart transplant. XXIII Cong ISBT Abstract 13 (1994)

[9] Brand, A.: Passenger leukocytes, cytokines anf transfusion reaction. N Engl J Med 331, 670-671 (1994)

[10] Brand, A., Claas, F.H.J., Voogt, P.J., Wasser, M.N.J.M., Eernisse, J.G.: Alloimmunization after leukocyte-depleted multiple random donor platelet transfusion. Vox Sang 54, 160-166 (1988)

[11] Brittingham, T.C.; Chaplin, H.Jr.: Febrile transfusion reactions caused by sensitivity to donor leucocytes and platelets. JAMA 165, 819 (1957)

[12] Brubaker, D.B.: Clinical significance of white cell antibodies in febrile nonhemolytic transfusion reaction. Transfusion 30, 733-737 (1990)

[13] Bucher,U.: Labormethoden in der Hämatologie. Verlag Hans Huber, Bern, Stuttgart, Toronto, Huber, Laborreihe 5, 32-33 (1988)

[14] Busch, O.R.C.; Hop, W.C.J.; van Papendrecht, M.A.W.H., et al: Blood transfusion and prognosis in colorectal cancer. N Engl J Med 328, 1372-1376 (1993)

[15] Claas, F.H.J., Smeenk, R.J.T., Schmidt, R., van Steenbrugge, G.J., Eernisse, J.G.: Alloimmunization against the MHC antigens after platelet transfusion is due to contaminating leucocytes in the platelet suspension. Exp Hematol 9, 84-89 (1981)

[16] Decary, F.; Ferner, P.; Giavedoni, L., et al: An investigation of non-hemolytic transfusion reactions. Vox Sang 46, 277-285 (1984)

[17] De Rie M.A.; van der Plas-van Dalen, C.M.; Engelfriet, C.P., et al: The serology of febrile transfusion reactions. Vox Sang 49, 126-134 (1985)

[18] Dillard, G.H.L.; Brecher, G.; Cronkite, E.P.; Separation, concentration and transfusion of platelets. Proc Soc Exp Biol Med 78, 796-799 (1951)

[19] Duke,W.W.: The relation of blood platelets to hemorrhagic disease: description of a method for determining the bleeding time and coagulation time and report of three cases of hemorrhagic disease relieved by transfusion. JAMA 55, 1185-1192 (1910)

[20] Durchführung präparativer Hämaphersen zur Gewinnung von Blutbestandteilkonserven. Empfehlungen der Ständigen Hämapheresekommission der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie. Infusionsther Transfusionsmed 21, 222-231 (1994)

[21] Eernisse, J.G., Brand, A.: Prevention of platelet refractoriness due to HLA antibodies by administration of leukocyte-poor blood components. Exp Hematol 9, 77-83 (1981)

[22] Fisher, M., Chapman, J.R., Ting, A., Morris, P.J.: Alloimmunization to HLA antigens following transfusion with leukocyte-poor and purified platelet suspensions. Vox Sang 49, 331-335 (1985)

[23] Fletcher, G.F. et al.: Exercise standards: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. Circulation 91, 580-615 (1995)

[24] Garritsen, H.S.P., Krakowitzky, P., Härtel, K., et al: Comparison between Nageotte Hemocytometer and Flow Cytometer counting methods for the detection of residual leucocytes in plateletaphersis products. In: Hogman, C.E. (ed): Leucocyte depletion of blood components. VU University Press, Amsterdam, 131-136 (1994)

[25] Harth, J., Peschke, H., Kalb, R.: Einfluß periodischer Trenngrenzenregelung auf Ausbeute und Reinheit von mittels Zellseparator AS 104 gesammelten Thrombozyten und Plasmen. (Abstract) Infusionstherapie und Transfusionsmedizin 23, suppl 3, 20 (1996)

[26] Heiss, M.M.; Jauch, K-W.; Delanoff, C., et al: Blood transfusion modulated tumor recurrence - a randomized study of autologous versus homologous blood transfusion in colorectal cancer [abstract]. Proc Am Soc Clin Oncol 11, 172 (1992)

[27] Hirsch, E.O.; Gardner, F.H.: The transfusion of human blood platelets. J Lab Clin Med 39, 556-569 (1952)

[28] Holme, S., Snyder, E., Heaton, A., et al: In vitro and in vivo evaluation of cotton wool filtration of platelet concentrates obtained by automated and manual apheresis. Transfusion 32, 328-333 (1992)

[29] Kao, K.J., Mickel, M., Braine, H.G., et al: White cell reduction in platelet concentrates and packed red cells by filtration: a multicenter clinical trial. Transfusion 35, 13-19 (1995)

[30] Kao, K.J., Scornik, J.C.: Accurate quantitation of the low numbers of white cells in white cell depleted blood components. Transfusion 29, 774-777 (1989)

[31] Kautz, H., Wienhausen, V., Müller, N.: Comparison of plateletpheresis using Cobe Spectra and Fresenius AS 104. Infusionsther 18 (suppl 2), 54 (1991)

[32] Kautz, H., Wienhausen, V., Müller, N.: Comparison of plateletpheresis using Cobe Spectra System and Fresenius AS 104. Infusionstherapie 19, 59-60 (1992)

[33] Kretschmer, V.: Comparison of different plateletpheresis systems.

Infusionsther 18, 188-195 (1991)

[34] Kretschmer, V.: Current Trends in Platelet Transfusion - Transfusion Practices in Europe. Infusionsther Transfusionsmed 23, (suppl 1) 5-11 (1996)

[35] Kretschmer, V., Rossa, C.: Optimierung der Separation mit dem Zellseparator AS 104. Beitr Infusionsther. Basel, Karger, vol 28, 188-194 (1991)

[36] Lee, E.J., Schiffer, C.A.: Serial measurement of lymphocytotoxic antibody and response to non matched platelet transfusions in alloimmunized patients. Blood 70, 1727-1729 (1987)

[37] Lee, V.S.; Tarassenko, L.; Bellhouse, B.J.: Platelet transfusion therapy: platelet concentrate preparation and storage. J Lab Clin Med 111,371-383 (1988) ]

[38] Loos, J.A.; Van Aken, W.G.: Herstellung von Blutkomponenten. In: Mueller-Eckhardt, C. (Hrsg): Transfusionsmedizin, 1. Auflage, Springer, Berlin, 232-244 (1988)

[39] Lutz, P., Dzik, W.H.: Large-volume hemocytometer chamber for accurate counting of white cells (WBCs) in WBC-reduced platelets: validation and application for quality control of WBC-reduced platelets prepared by apheresis and filtration. Transfusion 33, 409-412 (1993)

[40] Masse, M.; Naegelen, C.; Pellegrini, N.; Marpaux, N.; Beaujean, F.: Validation of a simple method to count very low white cell concentrations in filtered red cells or platelets. Transfusion 32, 565-571 (1992)

[41] Menitove, J.E.; Mc Elligott, M.C.; Aster, R.H.: Febrile transfusion reaction: What components should be given next? Vox Sang 42, 318-321 (1982)

[42] Meryman, H.T.: Transfusion-induced alloimmunization and immuno-suppression and the effects of leukocyte depletion. Transfusion Med Rev 3, 180-193 (1989)

[43] Meryman, H.T.: Transfusion induced alloimmunization to HLA antigens following transfusion with leucocyte poor and purified platelet suspensions. Vox Sang 49, 331-335 (1985)

[44] Miller, J.P., Mintz, P.D.: The use of leukocyte-reduced blood-components. Hematol. Oncol. Clin. North America 9, 69-90 (1995)

[45] Moog, R.: Die Bedeutung der Trenngrenzenposition bei der Thrombapherese mit dem Zellseparator AS 104. Infusionstherapie 19, 61-63 (1992)

[46] Moog, R., Holtmann, G., Holtmann, M., Luboldt, W.: Vergleich dreier Zellseparatortypen. Beitr Infusionsther. Basel, Karger, vol 26, 123-126 (1990)

[47] Moog, R., Kalb, R., Müller, N., Köbke, A.C.H.: Herstellung leukozytendepletierter Thrombozytapheresepräparate mittels geschlossener Einmalsysteme mit einem In-line-Filter für den Zellseparator AS 104. In: Sibrowski, W., Stangel, W., Müller, N. (Hrsg.): Transfusionsmedizin 1996/97. Beitr Infusionsther. Transfusionsmed. Basel, Karger, vol 34, 114-117 (1997)

[48] Moog, R., Luboldt, W., Biesel, W.: Effects of the Interface Position on Separation Efficiency and Cell Contamination in Platelet Pheresis with the Fresenius AS 104. (Abstract) Infusionstherapie 18, suppl 2, 52 (1991)

[49] Moog, R., Müller, N.: Thrombozytapherese mit dem Fresenius AS.TEC. 204 Blutzellseparator. (Abstract) Infusionstherapie und Transfusionsmedizin, 23,suppl 3, 22 (1996)

[50] Moroff, G.; Eich, J.; Dabay, M.: Validation of use of the Nageotte hemocytometer to count low levels of white cells in white cell-reduced platelet components. Transfusion 34, 35-38 (1994)

[51] Murphy, S.: Principles for storage of platelet concentrates. Infusionstherapie 18 (Suppl. 1), 3-9 (1991)

[52] Murphy, M.F., Metcalfe, P., Thomas, H., Eve, J., Ord, J., Lister, T.A., Waters, A.H.: Use of leukocyte blood components and HLA-matched platelet donors to prevent HLA alloimmunization. Br J Haematol 62, 529-534 (1986)

[53] Myelle, L.; Joos, M.; Wouters, E.,et al: Increased tumor necrosis factor a (TNFa), interleukin 1, and interleukin 6(IL-6) levels in the plasma of stored platelet concentrates: Relationship between TNFa and IL-6 levels and febrile transfusion reactions. Transfusion 33, 195-199 (1993)

[54] Myllylä, G., Ruuta, T., Kekomäki, R., Siimes, M.A.: Prevention of HLA alloimmunization by using leukocyte-free blood components (abstract). XX. Congress International Society for Blood Transfusion. London, 203 (1988)

[55] Neppert, J.: Therapeutische Plasmapherese und Zytapherese. In: Mueller-Eckhardt, C. (Hrsg): Transfusionsmedizin, 1. Auflage, Springer, Berlin, 533-551 (1988)

[56] Oksanen, K., Elonen, E.: Impact of leukocyte-depleted blood components on the haematological recovery and prognosis of patients with acute myeloid leukaemia. Br J Haematol 84, 639-647 (1993)

[57] Opelz, G.; Sengar, D.P.S.; Mickey, M.R., et al: Effect of blood transfusions on subsequent kidney transplants. Transplant Proc V, 253-259 (1973)

[58] Pachmann, U., Schill, E., Rosenhainer, B., Biesel, W., Offner, R.: Influence of varying blood flow rates on separation efficiency, cell contamination and donor reactions in plateletpheresis with Fresenius AS 104. Infusionsther 18 (suppl 2), 52 (1991)

[59] Pachmann, U.,Schill,E., Rosenhainer, B., Biesel,W., Offner, R.: Influence of varying blood flow rates on separation efficiency, cell contamination and donor reactions in plateletpheresis with FRESENIUS AS 104. (Abstract) Infusionstherapie 19, 52 (1992)

[60] Pamphilon, D.H., Farrel, D.H., Donaldson, C., Raymond, P.A., Brady, C.A.: Development of lymphocytotoxic and platelet-reactive antibodies : A prospective study in patients with acute leukaemia. Vox Sang 57, 177-181 (1989)

[61] Perkins, H.A.; Payne, R.; Fergueson, J., et al: Nonhemolytic febrile transfusion reactions. Quantitative effects of blood components with emphasis on isoantigenic incompatibility of leucocytes. Vox Sang 11, 578-599 (1966)

[62] Peters, W.R.; Fry, R.D.; Fleshman, J.W., et al: Multiple blood transfusion reduce the recurrance rate of Crohn`s disease. Dis Colon Rectum 32, 749 (1989)

[63] Radtke,H.: Quantitative Durchflußzytometrie: Absolutzahlmessungen in Vollblut und Blutkomponenten. Infusionsther. Transfusionsmed. 23, 114 (1996)

[64] Radtke, H., Lindenau, S., Holbach, B., et al: Durchflußzytometrische Messung der Leukozytenzahl in Vollblut und Blutkomponenten. Infusionsther. Transfusionsmed. 22, suppl 1 (1995)

[65] Raffael, A.: Grundlagen der analytischen Durchflußzytometrie. GIT Labor-medizin 3, 89-97 (1988)

[66] Rebulla, P., Dzik, W.H.: Multicenter evaluation of methods for counting residual white cells in leucocyte-depleted red blood cells. Vox Sang 66, 25-32 (1994)

[67] Saarinen, U.M., Kekomäki, R., Siimes, M.A., Myllylä, G.: Effective prophylaxis against platelet refractoriness in multitransfused patients by the use of leukocyte-free blood components. Blood 75, 512-517 (1990)

[68] Saarinen, U.M., Koskimies, S., Myllylä, G.: Systematic use of leukocyte-free blood components to prevent alloimmunization and platelet refractoriness in multitransfused children with cancer. Vox Sang 65, 286-292 ( 1993)

[69] Sadoff, B.J., Dooley, D.C., Kapoor, V., et al: Methods for measuring a 6 $\log_{10}$ white cell depletion in red cells. Transfusion 31, 150-155 (1991)

[70] Schiffer, C.A., Datcher, J.P., Aisner, J., Hagge, D., Wiernik, P.H., Reilly, J.P.: A randomized trial of leukocyte-depleted platelet transfusions to modify alloimmunization in patients with leukemia. Blood 62, 815-820 (1983)

[71] Sloand, E.; Kumar, P.; Klein, H.G., et al: Transfusion of blood components to persons infected with human immunodeficiency virus type 1: Relationship to opportunistic infection. Transfusion 34, 48-53 (1994)

[72] Sniecinski, I., O`Donnell, M.R.: Preventing refractoriness to random donor platelet transfusion. Transfusion 26, 582 (1986)

[73] Sniecinski, J., O`Donnell, M.R., Nowicki, B., Hill, L.R.: Prevention of refractoriness and HLA alloimmunization using filtered blood products. Blood 71, 1402-1407 (1988)

[74] Stangel,W.: Gewinnung, Konservierung, Lagerung von Transfusionsblut. In: Mueller-Eckhardt, C. (Hrsg.): Transfusionsmedizin, 1.Auflage, Springer, Berlin, 207-209 (1988)

[75] Stefanini, M.; Damashek, W.: Collection, preservation and transfusion of platelets. N Engl J Med 248, 797-802 (1953)

[76] Takahashi, T.A., Hosoda, M., Abe, H., et al: Comparison of highly sensitive methods used to count residual leucocytes in filtered red cell and platelet concentrates. In: Sekiguchi,S. (ed.): Clinical appl. of leucocyte depletion. Blackwell Scientific Pub, Oxford, 77-91 (1993)

[77] Thompson, K.S.; Plapp, F.V.; Long, N.D., et al: CMV infection in heart transplant recipients. Transfusion 32 (Suppl), 65S (1992)

[78] Ulrich, E.R., Kalb, R.: Plateletpheresis with the periodically alternating Interface Position (PAIP) Software for the Fresenius AS 104: The Influence of different Interface Profiles. (Abstract) Infusionstherapie und Transfusionsmedizin 23, suppl 3, 22 (1996)

[79] Ulrich, E.R., Kalb, R.: Plateletpheresis with the periodically alternating Interface Position (PAIP) Software for the Fresenius AS 104: The Influence of Variations of the Collection Phase. (Abstract) Infusionstherapie und Transfusionsmedizin 23, suppl 3, 23 (1996)

[80] Vachula,M., Simpson, S.J., Martinson, J.A., et al: A flow cytometric method for counting very low levels of white cells in blood and blood components. Transfusion 33, 262-267 (1993)

[81] Valbonesi, M., Frisono, R., Fella, M., Capra, C., Malfanti, L., Ferrari, M., Zia, S., Florio, G., Nickel, H.: Plateletpheresis with the new Fresenius AS 104 blood cell separator. J Clin Apheresis 6, 84-87 (1991)

[82] Vamvakas, E.; Kaplan, H.S.: Early transfusion and length of survival in acquired immune deficiency syndrome: Experience with a population receiving medical care at a public hospital. Transfusion 33, 111-118 (1993)

[83] Van Marwijk Kooy, M., van Prooijen, H.C., Borghuis, L., et al: Filtration: A method to prepare white cell-poor platelet concentrates with optimal preservation of platelet viability. Transfusion 30, 34-38 (1990)

[84] Van Marwijk Kooy, M., van Prooijen, H.C., Moes, M., Bosma-Stants, J.: Use of leukocyte-depleted platelet concentrates for the prevention of refractoriness and primary HLA alloimmunization: A prospective randomized trial. Blood 77, 201-205 (1991)

[85] Ward, J.W.; Bush, T.J.; Herbert, B.S., et al: The natural history of transfusion-associated infection with human immunodeficiency virus. N Engl J Med 321, 947-952 (1989)

[86] Wenz,B.,Besso.N.: Quality control and evaluation of leucocyte-depleting filters. Transfusion 29, 186-187 (1989)

[87] Wenz, B., Burns, E.R., Lee, V., Miller, W.K.: A rare-event analysis model for quantifying white cells in white cell-depleted blood. Transfusion 31, 156-159 (1991)

[88] Williams, J.G.; Hughes, L.E.: Effect of perioperative blood transfusion on recurrence of Crohn`s disease. Lancet 2, 131 (1989)

[89] Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer und des Bundesgesundheitsamtes. Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion. Deutscher Ärzteverlag Köln, (1991)

[90] Zeiler, T., Kretschmer, V.: In-line-Leukozytendepletion von Thrombozytapherese-konzentraten mit dem Fresenius-AS-104-Zellseparator. In: Sibrowski, W., Stangel, W., Müller, N. (Hrsg.): Transfusionsmedizin 1996/97, Beitr Infusionsther Transfusionsmed. Basel, Karger, vol 34, 110-113 (1997)

[91] Zeiler,T., Weisbach,V., Zingsem,J., et al: Erste Erfahrungen im Routineeinsatz des Zellseparators AS-104 im Single-needle-Verfahren. In: Kretschmer, V., Stangel,W., Eckstein, R. (Hrsg.): Transfusionsmedizin 1992/93. Beitr Infusionsther. Freiburg, Karger, vol 31,100-103 (1993)

[92] Zingsem, J., Weisbach, V., Zeiler, T., Zimmermann,R., Neidhardt, B., Eckstein, R.: Are single-needle protocols equivalent to dual-needle protocols for platelet apheresis? In: Sibrowski, W., Stangel, W., Wegner, S. (Hrsg.): Transfusionsmedizin 1993/94, Beitr Infusionsther Transfusionsmed. Basel, Karger 32, 328-333 (1994)

[93] Zingsem, J., Zeiler, T., Moog, R., et al: Erfahrungen aus der klinischen Erprobung des neuen Zellseparators Fresenius AS.TEC 204. (Abstract) Infusionstherapie und Transfusionmedizin, 23, suppl 3, 24 (1996)

# Kapitel VII

# Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Dr.-Ing. H. Kiesewetter danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, die Räumlichkeiten und Geräte am Institut für Transfusionswesen des Universitätsklinikums Charité nutzen zu dürfen.

Besonderen Dank gebührt meinem Doktorvater, Herrn OA Dr. med. H. Radtke, der mich mit großer Kompetenz und Verbindlichkeit durch das Labyrinth wissenschaftlicher Arbeit begleitet und geführt hat.

Zum Gelingen dieser Arbeit haben auch Frau S. Neumann sowie die anderen Mitarbeiter des Immunhämatologischen Laboratoriums wesentlich beigetragen, für deren sachkundige Einführung in die Labortechnik ich mich herzlich bedanken möchte.

Weiterhin danke ich den Schwestern der Aphereseabteilung der Charité für ihre Unterstützung bei der Probengewinnung.

Peter Späth möchte ich für die Zeit danken, die er mit mir grübelnd über der Erstellung von Grafiken und Tabellen verbracht hat.

Meinem Liebsten, Norbert Schmitter, danke ich für seinen kritischen Blick auf die einzelnen Kapitel dieser Arbeit und die konstruktiven Ideen beim Durchsehen der Dissertation.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern für ihre stetige Hilfsbereitschaft und umfassende Unterstützung.

# Kapitel VIII

# Eidesstattliche Erklärung

## Eidesstattliche Erklärung

Ich, Bettina Balke, geboren am 29.05.1968 in Berlin, wohnhaft Lemkestraße 191, 12623 Berlin, erkläre an Eides statt, daß die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Bettina Balke