Aus dem Institut für

Transfusionsmedizin und Immunhämatologie

der Medizinischen Fakultät Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Qualitätskontrolle von Blutkomponenten nach GMP

(„Good Manufacturing Practice“)

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Susanne Schüler
aus Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

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

2. Prof. Dr. E. Morgenstern

3. Prof. Dr. F. Jung

Datum der Einreichung: 24.09.1999
Datum der Promotion: 22.05.2000

Zusammenfassung

Um die Qualität von Blutprodukten nach GMP zu überprüfen, wurden 72 Blutspenden bzw. ihre Folgeprodukte Erythrozytenkonzentrat in PAGGS-M, gefiltertes Erythrozytenkonzentrat und Fresh Frozen Plasma untersucht. Zusätzlich wurden an jeweils 12 Blutderivaten, die z.T. nicht zum Routineprogramm des Blutspendedienstes der Abteilung für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin in Homburg/Saar gehören, Messungen durchgeführt, um ihre Qualität am Herstellungstag und am Ende der Haltbarkeit zu bestimmen. Als letztes wurden schließlich auch rheologische Parameter an 21 Erythrozytenkonzentraten in PAGGS-M und Fresh Frozen Plasma über einen Zeitraum von 28 Tagen gemessen und dokumentiert. Die Messung der Parameter, sowohl hämatologische als auch hämostaseologische und hämorheologische, erfolgte nach Standardmethoden.

Die Ergebnisse waren insgesamt nicht zufriedenstellend.

Ausschlaggebende Grundlage der Untersuchung sind die GMP-Richtlinien, die sich an den europäischen Normen orientieren.

Zwar zeigten die Produkte, die routinemäßig hergestellt werden, wie auch die, die nur für diese Untersuchung produziert wurden, in vielen Bereichen ein Übereinstimmen mit den Vorschriften. Speziell auch die Qualität der gefilterten Erythrozytenkonzentrate, die besonders für Immun-supprimierte wegen ihres niedrigen Gehalts an Leukozyten verwendet werden, war in vielen Fällen gut.

Die Ergebnisse der rheologischen Messungen glichen denen anderer Studien: so wurde ein Abfall der Fließfähigkeit über den Meßzeitraum hinweg beobachtet, was auf ein leichtes Schwellen der Zellen und eine Zunahme der Rigidität zurückzuführen ist. Fast durchgängig wich der Meßwert für den Hämatokrit der EK von der Richtlinie ab, am stärksten in PAGGS-M. Als Grund hierfür wurde eine Meßungenauigkeit des elektronischen Zellzählers bzw. die Methode der Bestimmung angesehen, so daß eine echte Abweichung als unwahrscheinlich anzusehen ist.

Jedoch wurde die vorgeschriebene maximale Hämolyserate mit Ablauf der Haltbarkeit häufig überschritten, ebenso wie die gemessenen Leukozytenzahlen. Eine Vielzahl der Plasmen war durch Erythrozyten und Leukozyten kontaminiert. Durch häufige Waschvorgänge beim Auftauen von

tiefgefrorenen EK wurde ein erhöhter Hb-Überstand erzeugt, das geforderte Mindestvolumen wurde dabei unterschritten.

Daher ist festzuhalten, daß für jede untersuchte Produktgruppe Abweichungen festgestellt wurden, die in diesem Maße nicht tolerabel sind. Damit ist die Qualität der Produkte insgesamt als unzureichend zu bezeichnen.

Der hier geführte Nachweis dieser Abweichungen ermöglichte die Einführung geänderter Herstellungsverfahren, so daß die heute erzeugten Produkte den Qualitätsvorschriften entsprechen.

Schlagwörter: Qualität, Blutprodukte, Europäische Richtlinien, Blutspende

Abstract

72 blood donations and their follow-up products (red blood cell concentrates resuspended in PAGGS-M, leukocyte-reduced red cell concentrates and fresh frozen plasma) were investigated to check their quality. Additionally, tests were performed on blood components of which most were not part of the routine program in the Department of Hemostaseology and Transfusion Medicine in Homburg/Saar. Finally, rheological parameters of red blood cell concentrates in PAGGS-M and of fresh frozen plasma were measured and documented over a period of 28 days.

The results were not satisfying.

Both the routine products and the blood components which were only produced for this study met the GMP-guidelines in many cases.

Especially the quality of leukocyte-reduced red blood cell concentrates which are used especially for the transfusion for immunocompromised patients was good.

The results of the rheological measurements were similar to those of other studies: decreasing flow over a period of time which was put down to slight swelling of the cells and to a rise in erythrocyte rigidity. The average hematokrit of red cell concentrates was generally too low especially in PAGGS-M. The reason for this was thought to be the electronic cell counter or rather the method of measuring.

Hemolysis after storage and mean leucocyte count often exceeded the official dates. Many samples of the FFP were contaminated with red and white blood cells. Repeated washing after thawing of frozen red blood cell concentrates caused an excess of extracellular haemoglobin and low concentrate volumes.

donationAny deviation from the guidelines is not tolerable. After this study adjustments in the production could be made so blood products now meet all of the requirements.

Keywords: quality, blood products, European guidelines, blood

Gliederung

I Einleitung 3

I.1 Allgemeine Einleitung 3

I.1.1 Definition des Begriffs „Qualität“ 3

I.1.2 Historischer Rückblick zur Bluttransfusion 3

I.1.3 Entwicklung von gesetzlichen Richtlinien 4

I.2 Eigene Aufgabenstellung 6

II Methodik 8

II.1 Versuchsplanung 8

II.2 Material und Meßgeräte 9

II.3 Meßmethoden 18

II.3.1 Hämatologische Parameter 18

II.3.2 Hämostaseologische Parameter 22

II.3.3 Hämorheologische Parameter 23

II.4 Durchführung der Versuche 24

II.4.1 Separation 24

II.4.2 Filterung von Erythrozyten-Konzentraten 25

II.4.3 Kryokonservierung 26

II.4.4 Thrombozytapherese 27

II.4.5 Rheologische Messungen 28

II.5 Statistik 28

II.6 Berechnung des Volumens 29

III Ergebnisse 30

III.1 Qualität der Blutprodukte 30

III.2 Funktionelle Parameter 41

IV Diskussion 43

IV.1 Vollblut 43

IV.2 Humanerythrozytenkonzentrat (buffy-coat-frei) 44

IV.3 Humanerythrozytenkonzentrat in additiver Lösung (buffy-coat-frei) 44

IV.4 Gefiltertes Humanerythrozyten-Konzentrat 47

IV.5 Tiefkühlkonserviertes Erythrozytenkonzentrat 48

IV.6 Thrombozytenpräparation 50

IV.7 Plasma 53

IV.8 Rheologische Untersuchungen 55

I Abkürzungsverzeichnis

AMG	Arzneimittelgesetz
ATP	Adenosintriphosphat
BGA	Bundesgesundheitsamt
BPU	Betriebsverordnung für pharmazeutische Unternehmer
BV	Blutviskosität
CPD	Citronensäure-Phosphat-Dextrose
CPDA-1	Citronensäure-Phosphat-Dexrose-Adenin
2,3-DPG	2,3-Diphosphoglycerat
EK	Erythrozytenkonzentrat
EU	Europäische Union
EZ	Erythrozytenzahl
FFP	Fresh Frozen Plasma=gefrorenes Frischplasma
GMP	Good Manufacturing Practice
LZ	Leukozytenzahl
MCV	Mean Corpuscular Volume
PAAGS -M	Phosphat-Adenin-Guanosin-Glucose-Saline-Mannitol
PEP	Phosphoenol-Pyrophosphat
PIC	Pharmaceutic Inspections Convention

PV	Plasmaviskosität
SAG-M	Saline-Adenin-Glucose-Mannitol
SER	Serum-Erythrozyten-Rigidität
TZ	Thrombozytenzahl
WHO	World Health Organisation

II Einleitung

II.1 Allgemeine Einleitung

II.1.1 Definition des Begriffs „Qualität“

Der Begriff Qualität wird definiert als die Gesamtheit der charakteristischen Eigenschaften eines Produktes bzw. seine Güte.

Man kann zwischen objektiver Qualität, d.h. den meßbaren Eigenschaften eines Stoffes, und subjektiver Qualität, der “Abstufung des Eignungswertes gleichartiger Güter für die Befriedigung bestimmter Bedürfnisse” [BROCKHAUS ENZYKLOPÄDIE, 1994], unterscheiden. Zur Beurteilung der Qualität sind u.a. Güte- und Verbandszeichen üblich. Bei den Blutprodukten bzw. den Herstellern von Blutprodukten ist das die Produktion nach GMP („Good Manufacturing Practice“).

Bei der Qualitätskontrolle handelt es sich allgemein um die “Überwachung der Qualität von in Massen produzierten Gütern mit Hilfe von statistischen Methoden” [BROCKHAUS ENZYKLOPÄDIE, 1994].

II.1.2 Historischer Rückblick zur Bluttransfusion

Im Jahre 1667 transfundierte der Franzose Denis zum ersten Mal erfolgreich Tierblut auf einen Menschen [MYHRE, 1989]. Doch nach einigen Mißerfolgen kam man sehr schnell von der Blutübertragung ab, und sie blieb verpönt bis ins Jahr 1818. In diesem Jahr versuchte James Blundell, ein Londoner Physiologe und Geburtshelfer, als erster Mensch-zu-Mensch-Transfusionen, um den massiven Blutverlust einiger Frauen bei der Entbindung auszugleichen. An Blundells z. T. erfolgreiche Transfusionen schloß sich eine Zeit des intensiven Experimentierens und neuer Erkenntnisse über das Blut und seiner Zusammensetzung an. Aber erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts mit der Entdeckung des AB0-Systems durch Landsteiner und DeCastello konnten die wichtigsten Probleme der Transfusionsmedizin gelöst werden [GRUNDMANN, 1993]. Weitere 30 Jahre später konnte das wichtigste Antigen des Rh-Systems nachgewiesen werden, und bald danach wurden die restlichen Rh-Antigene und andere Blutgruppen entdeckt.

Auch die Technik der Bluttransfusion entwickelte sich sehr schnell. Bei James Blundell wurde das Blut indirekt vom Spender auf den Empfänger mit Schläuchen und verschiedenen Geräten übertragen. Meist erfolgte die Blutspende jedoch direkt, d.h. der Spender ließ sein Blut direkt in die eröffnete Vene des Empfängers tropfen.

Schon 1890 zeigten zwei Schweizer den gerinnungshemmenden Effekt von Natriumsalz, aber erst 1914 führte Hustin aus Belgien Natriumzitrat als Blutgerinnungshemmer ein [MÜLLER, 1979]. Mit der Zufuhr von Glukose gelang es Rous und Turner 1916, die Lebensdauer von Erythrozyten zu verlängern und damit die verzögerte Transfusion zu ermöglichen [HUTCHIN, 1968].

Damit konnten erstmals größere Mengen Blut in Glasflaschen gelagert werden und Blutbanken entstanden, um den stark gestiegenen Bedarf an Blut während der großen Kriege dieses Jahrhunderts zu decken.

Während der zwei Weltkriege konnten weitere Erkenntnisse gewonnen werden. So perfektionierten Loutit und Mollison 1943 die Verwendung von Zitrat, indem sie mit einer Mischung aus Zitrat und Dextrose die Lagerungsfähigkeit von Blut auf 21 Tage ausdehnten. In den letzten 50 Jahren konnte mit weiteren Stabilisatoren und Additivlösungen die Haltbarkeit der Blutkonserven auf heute sieben Wochen erweitert werden; mittels Tieffrieren bei -196°C wurde sogar eine Lagerungsdauer von über 10 Jahren dokumentiert [UMLAS, 1991].

Später wurde Vollblut in seine korpuskulären und plasmatischen Bestandteile aufgetrennt. Damit konnte eine weitere Verbesserung erreicht werden, da die einzelnen Komponenten unterschiedlich gelagert werden können. Durch den Einsatz automatischer Zellseparatoren, Mehrfachbeutelsystemen und Langzeit-Konservierungsmethoden wurde die Qualität der Blutprodukte weiter verbessert.

II.1.3 Entwicklung von gesetzlichen Richtlinien

Mit zunehmendem Bedarf an Blutprodukten wurde die Forderung nach Richtlinien für Herstellung und Qualitätskontrolle immer lauter. Laut Definition im Arzneimittelgesetz sind Arzneimittel „Stoffe und Zubereitungen aus Stoffen, die dazu bestimmt sind, durch Anwendungen am oder im menschlichen [...] Körper vom menschlichen [...] Körper erzeugte Wirkstoffe oder Körperflüssigkeiten zu ersetzen" [ARZNEIMITTELGESETZ, 6.Novelle, 1996]. So zählt auch Blut

zu den Arzneimitteln und wird in den Gesetzen, die für Arzneimittel gelten, mitberücksichtigt.

Im Jahre 1968 wurde von der WHO die erste Fassung der bis heute mehrmals überarbeiteten Grundregeln erarbeitet, deren revidierte Form 1975 den Titel “Good Practice in the Manufacture and Quality Control of Drugs” trug.

Abgeleitet von dem Begriff “Good Manufacturing Practice” hat sich die Abkürzung GMP international durchgesetzt, womit man häufig nicht nur die Grundregeln der WHO, sondern gelegentlich auch ähnliche Richtlinien nationaler Gesundheitsbehörden meint [OESER, 1991]. So wird in den GMP-Richtlinien Qualitätskontrolle wie folgt charakterisiert: ”Qualitätskontrolle ist Teil der Guten Herstellungspraxis, der sich mit Probenentnahme, Spezifikation und Prüfung, sowie Organisation, Dokumentation und Freigabeverfahren befaßt, wodurch gewährleistet wird, daß die jeweils notwendigen Prüfungen tatsächlich durchgeführt werden und sowohl Material für den Gebrauch als auch Produkte für Verkauf oder Auslieferung erst freigegeben werden, wenn ihre Qualität als zufriedenstellend beurteilt wurde.”

In das deutsche Recht wurden die WHO-Leitsätze 1976 mit dem “Gesetz zur Neuordnung des Arzneimittelrechts” übernommen, dessen wesentliche Rechtsverordnungen in Form von Betriebsverordnungen erlassen wurden. Mit dem AMG soll die ”Sicherheit im Verkehr mit Arzneimitteln, insbesondere Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit von Arzneimitteln” [ARZNEIMITTELGESETZ, 6. Novelle, 1996] gewährleistet werden. Es enthält neben Vorschriften zur Herstellung, Zulassung und Abgabe auch Regelungen zur Haftung bei Arzneimittel-Schäden.

In der neuesten Fassung der “Betriebsverordnung für pharmazeutische Unternehmer” [1991] werden die allgemeinen Rahmenbedingungen für Herstellung und Qualitätskontrolle von Arzneimitteln vorgegeben, nicht aber detaillierte Regelungen für verschiedene Arzneimittelgruppen, wie z.B. Blutprodukte. Genauere Vorgaben hinsichtlich Zusammensetzung, pharmakologischen Eigenschaften und klinischen Angaben wie Anwendungsgebiet, Kontraindikation und Nebenwirkung sind in der “Bekanntmachung über Zulassung und Registrierung von Arzneimitteln” [BUNDESANZEIGER, 1989] enthalten.

Mit Produktmonographien folgt das Bundesgesundheitsamt der Forderung aus §25 Abs.7 AMG, “wissenschaftliches Erkenntnismaterial für die Arzneimittel, die nicht der automatischen

Verschreibungspflicht nach §49 AMG unterliegen, durch Kommissionen aufbereiten zu lassen und die Ergebnisse bekannt zu machen. Diese Aufbereitung bezieht sich auf die nach §22 Abs.3 AMG erforderlichen Angaben zur Wirksamkeit und Unbedenklichkeit" [ARZNEIMITTELGESETZ, 1996].

In Anlehnung an GMP, AMG und BPU wurden "Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion (Hämotherapie)" vom WISSENSCHAFTLICHEN BEIRAT DER BUNDESÄRZTEKAMMER UND VOM BUNDESGESUNDSHEITSAMT [1996] herausgegeben, in denen die Blutprodukte betreffenden Punkte der oben genannten Vorschriften enthalten sind.

Parallel zu den Bemühungen, die WHO-Richtlinien in nationales Recht umzusetzen, entstand auch eine Kommission der Europäischen Gemeinschaft, um für alle Mitgliedsstaaten einheitliche GMP-Richtwerte auszuarbeiten. Da die meisten europäischen Staaten gleichzeitig der "Pharmaceutic Inspections Convention" angehören, deren Grundregeln Basis für die BPU sind, sind wesentliche Elemente der PIC-Vorschriften in den EG-Entwurf eingeflossen.

Der 1995 herausgegebene "Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components" der EU setzt voraus, daß die PIC-GMP-Richtlinien eingehalten werden und beschäftigt sich mit dem Blutprodukt, seinen Inhaltsstoffen und Indikationen. Vergleichbar mit den vom Bundesgesundheitsamt herausgegebenen Monographien enthält er sehr viel genauere Angaben z.B. hinsichtlich serologischer Parameter und Häufigkeit der durchzuführenden Untersuchungen zur Qualitätskontrolle.

Diese Spezifikationen der Europäischen Gemeinschaft sind Basis der vorliegenden Untersuchung.

II.2 Eigene Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit soll belegt werden, ob die in der Abteilung für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg/Saar hergestellten Produkte die vorgeschriebenen Qualitätsmerkmale in bezug auf Hämatokrit, Hämoglobingehalt, Haltbarkeit etc. einhalten. Besonderes Interesse soll auch auf die Beschaffenheit von Blutkonserven für Kinder gerichtet werden. Diesem Anliegen wird in Homburg durch routinemäßiges Filtern der Erythrozytenkonzentrate Rechnung getragen. Hierbei werden, am

Beispiel der EK- Lagerung in PAGGS-M, ausgehend von der Vollblutspende, die jeweils daraus gewonnenen Produkte untersucht (Inprozeß-Kontrolle). Schließlich sollen zwei Verfahren zur Thrombozytengewinnung überprüft werden, die Thrombapherese und die Gewinnung aus einer Einzelblutspende.

Es soll nachgewiesen werden, ob hygienische Grundsätze bei der Abnahme und Weiterverarbeitung berücksichtigt werden und welchen qualitativen Einfluß verschiedene Konservierungsmethoden haben. Auch die funktionellen Eigenschaften gelagerter Konserven sollen über einen Zeitraum von vier Wochen verfolgt und dokumentiert werden.

Eine solche Untersuchung war bisher in der Abteilung für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg/Saar noch nicht durchgeführt worden. Zwar wurden die gesetzmäßig geforderten Qualitätskontrollen durch das medizinisch-technische Personal erledigt, jedoch noch zu keinem Zeitpunkt wurde eine statistische Aufarbeitung dieses Materials unternommen. Auch wurden die Ergebnisse bisher weder auf ihr Übereinstimmen mit den gesetzlichen Richtlinien überprüft noch wurde eventuelles Abweichen zum Anlaß für eine Suche nach Fehlern bzw. für Änderungen im Herstellungsprozeß genommen.

Dafür sollten mit den vorliegenden Ergebnissen die Voraussetzungen geschaffen werden; nach entsprechenden Veränderungen im Herstellungsprozeß und im Umgang mit den Blutprodukten sollte die Erlangung eines Zertifikates nach GMP möglich gemacht werden.

III Methodik

III.1 Versuchsplanung

Zur Überprüfung der Qualität der im Blutspendezentrum der Abteilung für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg/Saar hergestellten Blutderivate wird über das gesetzliche Maß hinaus, das die Kontrolle jeder 100. Spende fordert, jede 30. Spende überprüft.

Die Studie unterteilt sich in drei Abschnitte:

1. Bei 72 Spenden wird vom Ausgangsprodukt Vollblut und von den Folgeprodukten Erythrozytenkonzentrat (EK) in Additivlösung PAGGS-Mannitol, gefiltertes EK und Plasma kurz nach der Herstellung eine Probe entnommen, um Blutbilder zu erstellen und folgende zusätzliche Untersuchungen durchzuführen: Bei Vollblut und EK wird ein Blutausstrich für ein Leukozytendifferential-Blutbild hergestellt; der Erythrozytenverlust durch die Filterung wird bei den gefilterten EK berechnet, und bei den Plasmen wird Faktor V, VIII und Gesamteiweiß-Gehalt gemessen. Außerdem werden die jeweiligen Beutelvolumina durch Wiegen bestimmt.

2. Bei jeweils 12 Blutderivaten (Vollblut, Erythrozytenkonzentrat mit/ohne additive Lösung SAG-M, PAGGS-M und ADSOL, gefiltertes Erythrozytenkonzentrat, tiefkühlkonserviertes Erythrozytenkonzentrat) werden zu den oben erwähnten Untersuchungen die Hämolyserate nach Ablauf der jeweiligen Haltbarkeit bestimmt. Weiterhin werden verschiedene Parameter bei Thrombozytenhochkonzentraten (zwei Herstellungsmethoden) untersucht. Dabei wird nur das einzelne Derivat und nicht, wie oben, Ausgangsprodukt und daraus entstandene Folgeprodukte untersucht.

3. Bei 21 EK in PAGGS-M und Plasmen werden als funktionelle Parameter Hämatokrit, Plasmaviskosität, Blutviskosität, Erythrozytenrigidität und das mittlere Erythrozytenvolumen MCV am Tag 0, 7, 14, 21 und 28 nach der Herstellung bestimmt.

III.2 Material und Meßgeräte

1. Separation

Beutelsysteme

PVC-Dreifachbeutel mit Oben/Unten-Abgang mit 63ml CPD und 100ml SAG-M, PAGGS-M (beide Biotrans GmbH (Dreieich)), oder 70ml CPD mit 110ml ADSOL (Baxter Deutschland GmbH (München))

PVC-Vierfachbeutel mit Oben/Unten-Abgang mit 63ml CPD und 100ml SAG-M, Biotrans GmbH (Dreieich)

PVC-Einfachbeutel mit 100ml $CPDA_1$ (Biotrans GmbH (Dreieich))

Additivlösungen

100 ml PAGGS-M enthalten:

Glucose-Monohydrat	940 mg
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	111 mg
Dinatriumhydrogenphosphat x 12 H_2O	114 mg
Adenin (Hydrochlorid)	25 mg
Guanosin	4,1 mg
Mannitol	1,0 g
Natriumchlorid	1,0 g
Aqua ad iniectabilia	ad 100 ml

100 ml SAG-M enthalten:

Glucose-Monohydrat	900 mg
Adenin (Hydrochlorid)	21,5 mg
Mannitol	525 mg
Natriumchlorid	877 mg
Aqua ad iniectabilia	ad 100 ml

100 ml ADSOL enthalten:

Glucose-Monohydrat	2,20 g
Adenin (Hydrochlorid)	34,3 mg
Mannitol	751 mg
Natriumchlorid	90 mg
Aqua ad iniectabilia	ad 100 ml

Stabilisatorlösungen

100 ml CPD enthalten:

Citronensäure-Monohydrat	327 mg
Natriumcitrat x H_2O	2,63 g
Glucose-Monohydrat	2,55 g
Natriumhydrogenphosphat x H_2O	251 mg

Aqua ad iniectabilia	ad 100 ml

100 ml $CPDA_1$ enthalten:

Citronensäure, wasserfrei	300 mg
Natriumcitrat x H_2O	2,63 g
Glucose, wasserfrei	2,9 g
Natriumhydrogenphosphat x H_2O	251 mg
Adenin	27,5 mg
Aqua ad iniectabilia	ad 100 ml

Zentrifugen

Hettich Rota Silenta/RP (Tuttlingen)mit zwei verwendeten Programmen:

No. 1 (starke Zentrifugation)		*No.3 schwache Zentrifugation*	
(Separation d. Blutspende)		(Thrombozytengewinnung)	
Anlaufzeit	240 sec.	Anlaufzeit	60 sec
Laufzeit	10 min.bei 4000 g	Laufzeit	3 min bei 400 g
Bremsstufe	5	Bremsstufe	1
Temperatur	22°C	Temperatur	22°C

Hettich Rotixa/A (Tuttlingen)

(Separation d. Proben - Reagenzgläser)

Laufzeit	10 min. bei 1200 g
Bremsstufe	6

Separatoren

Optipress, Baxter Deutschland GmbH (München)

Automatische Presse, Biotrans GmbH (Dreieich)

Schweißgerät

Hematron von Travenol, Baxter (München)

"Sterile docking"

SCD 312, Haemonetics (München)

Elektronischer Zellzähler

Sysmex M-2000, Digitana (Frankfurt) zur Erstellung der Blutbilder

Photometrische Messung der Hämoglobinkonzentration

Photometer 1101 M, Eppendorf GmbH (Hamburg)

Transformationslösung aus 3,1 g Kaliumhexacyanoferrat;

5,0 g Natriumhydrogencarbonat; 0,25 g Kaliumcyanid; Wasser ad 5000 ml

pH-Messung

pH M 64 Research pH Meter, Radiometer Copenhagen GmbH (Bonn)

Sterilitätskontrolle

70 ml BBL-Septi-Chek Blutkulturflaschen, Becton Dickinson and Company (Meylan, Frankreich).

2. Leukozytenfilterung

Leukozytenfilter

BPF 4, Pall Biomedizin GmbH (Dreieich) mit integriertem Auffangbeutel

Kammerzählverfahren

Nageotte-Zählkammer mit 50µl Volumen, Schreck Optik (Hofheim/Ts.-Lorsbach)

Unopette-Mikrocollection System mit 1980µl Ammonium-Oxalat-Vorlage, Becton-Dickinson, zu beziehen bei Döll Medizintechnik (Hofheim/Ts.)

3. Erythrozyten-Tieffrierung

Erythrozyten-Gefrierlösung

Art.Nr. 700 320, Biotrans GmbH(Dreieich)

1 l Gefrierlösung enthält:

Glycerol	380,0 g
Sorbitol	29,0 g
Natriumchlorid	6,30 g
Aqua ad iniectabilia	ad 1000 ml

Erythrozyten-Waschlösung

Art.Nr. 700 310, Biotrans GmbH(Dreieich)

1l Waschlösung enthält:

Sorbitol	175,0 g
Natriumchlorid	8,0 g
Aqua ad iniectabilia	ad 1000 ml

Zentrifuge

Hettich Rota Silenta/RP (Tuttlingen)

zum Auftauen verwendetes Programm

Anlaufzeit	120 sec
Laufzeit	4 min. bei 2000 g.
Bremsstufe	2
Temperatur	20°C

Tieffrierbeutel

Hemofreeze DF 700, Gambro Medizintechnik GmbH (Planegg)

aus Kapton/Teflon und Polyethylen

Transfusionsbestecke

Glycerisationsset GT1, Gambro Medizintechnik GmbH (Planegg)

Metallrahmen

Freezeenvelope E 700, Gambro Medizintechnik GmbH (Planegg)

Schweißgerät

Spezialgerät mit extralanger Schweißfläche, Gambro Medizintechnik GmbH (Planegg)

4. Faktorenbestimmung

Kugelkoagulometer KC 10, Amelung (Kerpen-Horrem)

Reagenzien der Fa. Immuno AG (Heidelberg):

Referenzplasma (Reference Plasma 100%, mit 100% Gehalt des zu untersuchenden Gerinnungsfaktors)

Mangelplasma (FaktorV- u. Faktor VIII-Mangelplasmen mit einer Gerinnungsaktivität <1%)

Immunoplastin

Citratpuffer

Phosphorlipidkaolin

Calciumchlorid (0,025 mol/ l)

Imidazolpuffer

5. Thrombozytengewinnung

Thrombapheresegeräte

CS-3000 Plus, Baxter GmbH (München)

AS-104, Fresenius AG (Bad Homburg)

Über-Kopf-Rotator

Platelet Rotator, Baxter GmbH (München)

Thrombozytenagitator

4010, Kottermann

6. Rheologische Messungen

Plasmaviscosimeter

KSPV-5, Fresenius (Bad Homburg)

Hämatokrit-Zentrifuge

Micro Hematocrit Centrifuge, Hawksley (London)

SER

Selektives Erythrozytenrigidometer, Myrenne (Roettgen)

7. Bestimmung des Glycerin-Gehaltes

Test-Kombination, Boehringer Mannheim

bestehend aus

1. 2g Coenzym/Puffergemisch aus Glycylglycin-Puffer, pH 7,4; 7 mg NADH; 22 mg ATP; 11 mg PEP; Magnesiumsulfat; Stabilisatoren
2. 0,4 ml Suspension aus 240 U Pyruvat-Kinase; 220 U Lactat-Dehydrogenase
3. 0,4 ml Suspension aus 34 U Glycerokinase
4. Glycerin-Standard-Lösung zur Testkontrolle

8. Messung der Osmolarität

Semi-Micro-Osmometer, Knauer

9. Messung der Gesamt-Eiweiß-Konzentration

Biuret-Reagenz aus Kupfer-Sulfat, Natrium-Kalium-Tartrat, Kaliumjodid, Natronlauge

III.3 Meßmethoden

III.3.1 Hämatologische Parameter

1. Haemolysine

Definition: Substanzen, die eine Haemolyse herbeiführen, z.B. Antikörper, die bei Bindung an Erythrozyten-Antikörper Komplement aktivieren [Pschyrembel, 1989].

Haemolysintest: serologischer Nachweis haemolysierender Antikörper, die menschliche Testerythrozyten unter Aktivierung von Komplement haemolysieren.

Vorgehen: In Teströhrchen 1 werden 2 Tropfen des zu testenden Patientenserums mit 1 Tropfen Erythrozytensuspension der Blutgruppe A, in Teströhrchen 2 werden 2 Tropfen Patientenserum mit 1 Tropfen Erythrozytensuspension der Blutgruppe B vermischt. Nach Durchmischen werden die Röhrchen 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend anzentrifugiert und makroskopisch auf Hämolyse überprüft.

2. Freies Hämoglobin (extrazelluläres Hämoglobin)

Nach Zentrifugation wird der Überstand abgesaugt; daraus kann dann photometrisch der Gehalt an freiem Hämoglobin bestimmt werden. Zu 0,1 ml Überstand werden 1 ml Transformationslösung gegeben, bei 546 nm und 591 nm die Extinktion gemessen und nach folgender Formel berechnet:

$$freiesHb(mg/dl) = [E(546) - E(591)] \times 820{,}6$$

3. Hämolyserate

Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$Hämolyserate(in\%) = \frac{(100 - Hkt) \times freiesHb(g/l)}{totalesHb(g/l)}$$

4. Erythrozyten-Verlust

Die Berechnung erfolgt über Volumen und Hämatokrit von Ausgangskonserve und Endprodukt.

Erythrozyten-Verlust (in%) = Vol_{Aus} x Hkt_{Aus} - Vol_{End} x Hkt_{End}

5. Leukozytenzählung mit der Nageottekammer

Bei der Nageottekammer handelt es sich um eine Spezialkammer, mit der ein um ein Vielfaches größeres Volumen als mit der Neubauerkammer untersucht werden kann. Zur Zählung werden 220µl des zu untersuchenden Erythrozytenkonzentrats zu 1,98ml Ammoniumoxalat der Unopette gegeben und 10 min zur Lyse der Erythrozyten abgewartet. Dann werden ein oder zwei Nageotte-Kammern mit der verdünnten Probe befüllt und 10 min in eine feuchte Petrischale zur Sedimentation der Zellen gegeben. Anschließend können die befüllten Kammern im Phasenkontrastmikroskop ausgezählt werden.

Berechnung:

Gezählte Leukozyten in beiden Kammern = n

Leukozyten/µl = n x Verdünnungsfaktor / ausgezähltes Volumen in µl

Leukozyten/µl = n x 0,1

6. Bestimmung der Osmolalität

Messung der Gefrierpunktserniedrigung (Kryoskopie): In geeichte Glasküvetten werden 150µl des zu untersuchenden Mediums gegeben. Beim Unterschreiten des Gefrierpunktes wird ein Agitator in Gang gesetzt und die Kristallisation ausgelöst. Über einen in der Flüssigkeit befindlichen Temperaturfühler wird die dabei auftretende Gefrierpunktserniedrigung erfaßt und mit

Standardlösungen verglichen. Dazu wird das Gerät täglich mit Aqua dest. (0 mOsmol) und Eichlösung (400 mOsmol) geeicht. Die Meßskala zeigt dann die Osmolalität an [THOMAS, 1995].

Restgehalt an Kryoprotektivum

1 ml Plasma oder Serum wird Aqua bidest. gemischt und 5 min. erhitzt, anschließend zentrifugiert. 0,5 ml des Überstandes werden zum Test verwendet. Dazu werden in einer Küvette Lösung 1, die zu untersuchende Probe, Aqua bidest und Suspension 2 vermischt. Ein Leerwert, der statt der Probe Aqua bidest. enthält, wird mitgeführt. Nach Stillstand der Vorreaktionen werden die Extinktionen (E_1) von Probe und Leerwert bei 340 nm gemessen. Mit Suspension 3 werden weitere Reaktionen gestartet, nach Reaktionsstillstand werden die Extinktionen (E_2) gemessen.

Für Leerwert und Probe werden Extinktionsdifferenzen gebildet, dann wird die Extinktionsdifferenz des Leerwertes von der Probe abgezogen.

$$\Delta E = (E_1 - E_2)_{\mathrm{Pr}\,obe} - (E_1 - E_2)_{Leerwert}$$

Die Berechnung erfolgt dann nach folgender Formel

(F=Verdünnungsfaktor; e = Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm = 6,3 [l x mmol-1 x cm-1]):

$$c = \frac{0{,}5563 \times \Delta E \times F}{e} = 0{,}4371 \times \Delta E[gGlycerin / l\,\mathrm{Pr}\,obe)$$

8. Sterilitätskontrolle

Die entnommene Blutprobe (8-10ml) wird in eine BBL-Septi-Chek-Blutkulturflasche unter sterilen Kautelen übertragen, anschließend durch Kippen gemischt. Bei 35-37°C wird für mindestens sieben Tage inkubiert, bevor von Sterilität der Probe ausgegangen werden kann. Ein Bakterienwachstum kann meist schon innerhalb von 48 Stunden nachgewiesen werden. Dann sollte eine Gramfärbung oder eine geeignete Subkultur angelegt werden.

9. pH-Messung

Die Messung erfolgt mit Hilfe eines pH-Meters mit Glaselektrode. Diese ist an ihrem Ende zur Kugel aufgeblasen, um eine dünnwandige Membran zu formen und enthält eine Pufferlösung.

Durch den Unterschied des pH-Wertes in der zu untersuchenden Probe und der Pufferlösung entsteht ein Ionenaustausch, der elektrisch gemessen werden kann.

10. Differential-Blutbild

Die auf einem Objektträger ausgestrichene Blutprobe wird nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt und bei 400-facher Vergrößerung ausgezählt.

11. Gesamteiweißbestimmung (Biuretmethode)

Prinzip: Anlagerung von Kupferionen im alkalischen pH-Bereich an die Peptidbindungen von Proteinen und Peptiden. Die Intensität der dabei entstehenden Violett-Färbung ist linear der Zahl der Peptidbindungen und damit der Proteinkonzentration in einem weiten Bereich. Voraussetzung für die Reaktion ist das Vorhandensein von mindestens zwei Peptidbindungen (Tripeptid). Es muß ein Standard mitgeführt werden; empfohlen wird Rinderalbumin. Zur Bestimmung wird ein Teil Plasma zu 50 Teilen Biuret-Reagenz (Verhältnis 1:51) gegeben und nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur die Absorption der Analysenprobe und des Standards gegen Biuret-Reagenz gemessen. Die Konzentration berechnet sich nach folgender Formel:

$$c = 60 \times \frac{E(\mathrm{Pr}\,obe)}{E(S\,\mathrm{tan}\,dard)}$$

[THOMAS, 1995]

III.3.2 Hämostaseologische Parameter

Faktorenanalyse

Die Analyse des Gehaltes an Gerinnungsfaktoren erfolgt mit Hilfe von Mangelplasmen, denen ein definierter Gerinnungsfaktor fehlt. Mangelplasma wird mit Patientenserum in die Vertiefung eines Kugelkoagulometers gegeben und mit einer Kugel bewegt. Gleichzeitig wird eine Zeitautomatik in

Gang gesetzt. Sobald das Gemisch gerinnt, bleibt die Kugel stehen, und die Zeit wird gestoppt. Gleichzeitig werden definierte Konzentrationen eines Referenzplasmas gemessen, um mit den Gerinnungszeiten eine Bezugskurve erstellen zu können. Auf dieser Kurve kann man die Konzentration des zu untersuchenden Faktors ablesen.

III.3.3 Hämorheologische Parameter

1. Plasmaviskositätsmessung

Die zu untersuchende Probe wird blasenfrei in eine 2 ml Spritze aufgezogen, auf eine Spezialkanüle ohne Spitze wird ein dünner Kunststoffschlauch aufgesteckt. Die Mindestfüllung beträgt 0,5 ml. Die Spritze wird nun in die vorgesehene Vertiefung des Plasmaviskosimeters gelegt, ebenso der Schlauch. Nach dem Schließen der Frontplatte wird der Spritzenkolben automatisch vorgetrieben und so der Schlauch mit Plasma gefüllt. Sobald der Plasmabolus die erste Lichtschranke erreicht, wird der Füllvorgang beendet. Schlauch und Plasma werden innerhalb von 60 Sekunden auf 37°C thermostatisiert. Anschließend wird der Schlauch durchtrennt, der Plasmabolus beginnt zu laufen. Sobald die zweite Lichtschranke erreicht wird, startet die Zeitmessung bis zum Erreichen der dritten Lichtschranke. Aus bekannter Meßstrecke und gemessener Zeit wird nach dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz die Plasmaviskosität berechnet [KIESEWETTER, 1990].

2. Blutviskosität

Es wird ebenso vorgegangen wie zur Messung der Plasmaviskosität.

3. Erythrozytenrigidität

Dem Messverfahren liegt das Prinzip der Messung der Passagezeit einzelner Erythrozyten durch eine Einzellochmembran zugrunde. Das Kernstück des Meßgerätes ist die Einzellochmembran, eine Kunststoffolie mit einer zentralen Pore (Membrandicke L=20µm, Porendurchmesser 4µm). Die Membran trennt die Meßkammer in eine Unter- und eine Oberkammer. Die Neigung der Kammer ist so gewählt, daß die sedimentierten Erythrozyten auf der Membran hinabgleiten, und sofern sie im Einzugsgebiet der Pore sind, nacheinander die Pore passieren. Die Meßkammer liegt in einem thermostatisierten Aluminiumblock. Die Messung der Passagezeit einzelner Erythrozyten durch die Einzellochmembran erfolgt elektrisch. Der Ohmsche Widerstand eines Erythrozyten ist

deutlich höher als der Widerstand des Suspensionsmediums. Dadurch kommt es beim Durchtritt eines Erythrozyten zu einer Erhöhung des Gesamtwiderstandes. Für jede Erythrozyten-Population werden 250 Erythrozytenpassagen vermessen. Die mittlere Durchtrittszeit wird berechnet und durch die mittlere Durchtrittszeit einer Kontrollpopulation anscheinend Gesunder ohne Risikofaktoren dividiert. Diesen Quotienten bezeichnet man als standardisierte Erythrozytenrigidität [KIESEWETTER, 1990].

4. Hämatokrit (Zentrifuge)

Das Blut wird in eine heparinisierte Mikro-Glaskapillare aufgezogen, ein Ende wird verschweißt. Die Glaskapillare wird in die Vertiefung der Mikrohämatokrit-Zentrifuge gelegt und bei 12 000 g über 3 min. zentrifugiert. Dabei werden die Erythrozyten an dem verschweißten Ende zusammengepreßt; der Hämatokrit kann dann mit Hilfe einer Schablone abgelesen werden [THOMAS,1995].

III.4 Durchführung der Versuche

Standard-Voraussetzungen

Spenderauswahl und Blutspende: Die Auswahl der Spender erfolgt nach den in den Richtlinien für Bluttransfusion [WISSENSCHAFTLICHER BEIRAT DER BUNDESÄRZTEKAMMER UND VOM BUNDESGESUNDHEITSAMT, 1991] festgesetzten Kriterien.

Das mittels Venenpunktion gewonnene Vollblut wird in einen Beutel mit Konservierungsmittel CPD überführt und stellt so das Fertigarzneimittel oder den Ausgangsstoff für weitere Blutpräparationen während der anschließenden Fraktionierung dar. Als Fertigarzneimittel ist die Konserve 28 Tage bei 4°C haltbar. Alle zur Fraktionierung bestimmten Blutspenden müssen innerhalb von sechs Stunden verarbeitet werden.

III.4.1 Separation

Der Blutspendebeutel wird nach einer kurzen Ruhephase in die abnehmbare Zentrifugenhalterung eingelegt, sechs solche Halterungen werden genau austariert in die Zentrifuge eingehängt und mit Programm Nr. 1 zentrifugiert. Dann werden die Beutel sehr vorsichtig in je einen der Separatoren eingelegt, ein Restvolumen von 70ml wird entsprechend der Einstellung des Gerätes im

Spendebeutel verbleiben; während des automatischen Trennungsvorganges wird über den oberen Schlauchabgang das Plasma, über den unteren die gepackten Erythrozyten abgepreßt.

Um Erythrozytenkonzentrate ohne Additivlösung herzustellen, wird der Beutel mit dem Additiv z.B. PAGGS-M gegen einen Einfachbeutel mit dem Stabilisator (Antikoagulanz) $CPDA_1$ ersetzt.

Die beiden Endprodukte EK und Plasma werden mittels “sterile docking” mit einem kleinen Leerbeutel verschweißt, und 10 ml Blutderivat ohne weitere Entlüftung in den Leerbeutel überführt. An dieser geringen Menge können alle notwendigen Bestimmungen, auch nach Ende der Haltbarkeit, durchgeführt werden, das restliche Blutderivat kann weiterhin für die Transfusion verwendet werden.

Bei Verwendung eines Vierfachbeutels wird wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Restvolumen des Separators wird auf 100 ml eingestellt und wie gewohnt in Plasma und Erythrozytenkonzentrat getrennt. Bei Erreichen der vorgegebenen Restmenge wird der Separationsvorgang unterbrochen, die Beutel mit Plasma und Erythrozytenkonzentrat werden steril abgeschweißt.

Der Restbeutel mit dem Buffy-Coat wird nun nicht verworfen, sondern vorsichtig mit dem noch leeren Thrombozytenbeutel aus dem Separator entfernt und eine Stunde bei Raumtemperatur aufgehängt. Dabei sinken die im Beutel verbliebenen Zellen der Schwerkraft folgend nach unten. Danach wird eine Klemme oberhalb des Beutelinhaltes angebracht.

Danach werden die Beutel in einer speziellen Zentrifugenhalterung mit Programm Nr. 3 schwach zentrifugiert. Mit der automatischen Presse, deren Restvolumen zuvor auf 30 ml eingestellt wurde, wird das Thrombozytenkonzentrat sehr langsam in den dafür vorgesehenen Leerbeutel überführt. Dabei sollte keine sichtbare Verunreinigung des Konzentrats mit Erythrozyten erfolgen.

Nach Beendigung des Separationsvorganges wird die Schlauchverbindung zum Entnahmebeutel mit dem Thermoschweißgerät durchtrennt.

Das Thrombozytenkonzentrat kann bei Raumtemperatur (22°C) maximal fünf Tage gelagert werden und muß dabei kontinuierlich mit Hilfe eines Rotators bewegt werden.

Filterung von Erythrozyten-Konzentraten

Nach der Separation werden der EK-Beutel und der Plasma-Beutel wie üblich vom Vollblutbeutel abgeschweißt. Nach steriler Entnahme einer kleinen Probe in einen Extrabeutel mit dem SCD wird ein Leukozyten-Filtersystem an den Erythrozyten-Beutel geschweißt. Am Filtersystem wird entsprechend der Gebrauchsinformation die Einlaß- und Auslaßklemme geschlossen. Anschließend wird der Beutel mit dem EK so hochgehängt, daß der Filter senkrecht unter dem Beutel hängt. Durch Öffnen der Einlaßklemme kann der Filterungsvorgang begonnen werden.

Sobald der EK-Beutel leergelaufen ist, wird die Verschlußkappe des Blutrückgewinnungssystems entfernt, und die Hälfte des noch im Filter befindlichen Blutes fließt in den Transferbeutel. Auch dem gefilterten EK wird wieder eine kleine Probe entnommen, um verschiedene Parameter zu bestimmen.

Das gefilterte EK ist zum Verbrauch innerhalb von 24 Stunden bestimmt.

III.4.2 Kryokonservierung

a) Einfrieren

Zum Tieffrieren ist grundsätzlich jedes frische Erythrozytenkonzentrat geeignet. Bei der Separation ist jedoch darauf zu achten, daß zum Erythrozytenkonzentrat keine Additiv- oder Anti-Koagulationslösung zugefügt wird, da diese beim Einfrieren kristallisieren und dabei die Erythrozyten verletzten können. Der Beutel, der diese Lösung enthält, wird abgeschweißt und ein Leerbeutel angeschweißt. Innerhalb einer Stunde nach Separation muß die Weiterverarbeitung erfolgen. Dazu werden Erythrozytenkonzentrat, Erythrozyten-Gefrierlösung und der Gambro-Beutel durch ein spezielles Transfusionsbesteck mit drei Dornen miteinander verbunden. Dieser Vorgang muß unter einer Sterilitätsbank durchgeführt werden. Zuerst wird etwas Gefrierlösung dem Erythrozytenkonzentrat beigefügt, damit dieses etwas fließfähiger wird. Es wird zuerst in den Gambro-Beutel überführt, der auf einem Rüttler langsam bewegt wird. Anschließend wird die Gefrierflüssigkeit zum Erythrozytenkonzentrat hinzugefügt. Es ist darauf zu achten, daß identische Volumina der Gefrierlösung und des Konzentrats verwendet werden. Nach vollständiger Befüllung des Beutels wird dieser mit einem speziellen Schweißgerät von Gambro verschlossen. Es sollten drei Nähte gesetzt werden, um die Dichtigkeit zu garantieren.

Anschließend wird der Beutel in einen Metallrahmen gespannt und in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren. Zur Lagerung in flüssigem Stickstoff wird der Metallrahmen wieder entfernt.

b) Auftauen

Der tiefgefrorene Gambrobeutel wird im 37°C warmen Wasserbad in horizontaler Stellung langsam aufgetaut. Sobald keine Eisklumpen mehr fühlbar sind, wird die Suspension mit dem SCD in einen Leerbeutel umgefüllt. Nachdem eine kleine Probe entnommen wurde, werden 120 bis 150 ml Waschlösung zugefügt und gut gemischt. Nach Zentrifugation wird der Überstand mit einem Separator (z.B. von Biotrans) entfernt. Dazu muß erst ein kleiner Abfallbeutel steril angeschweißt werden, in den dann vorsichtig der Überstand abgepreßt wird. Dabei wird auch die oberste Zellschicht mitentfernt, indem 10 cm des zum Abfallbeutel führenden Schlauches gefüllt werden. Das verbleibende Sediment wird mit 200 ml physiologischer NaCl-Lösung aufgefüllt, leicht durchmischt und ein zweites Mal zentrifugiert. Der Überstand wird über einen weiteren Abfallbeutel verworfen. Man verfährt dann weiter wie vorher, bis der Überstand makroskopisch nicht mehr hämolytisch erscheint, maximal aber viermal. Zum Schluß wird wiederum eine Probe entnommen, aus der der Glyzeringehalt bestimmt wird.

III.4.3 Thrombozytapherese

Die Gewinnung der Thrombozytenkonzentrate erfolgt entsprechend der Anleitung der Hersteller der Thrombapheresegeräte.

Unmittelbar nach Fertigstellung der Thrombozyten-Hochkonzentrate werden je eine Lifecell Gewebekulturbeutel (300 ml aus PTL 732 Plastic) bzw. ein “Konzentrat-Musterbeutel” (500 ml, aus Polyolefin) an das entsprechende Thrombozyten-Hochkonzentrat derselben Herstellerfirma steril angeschweißt. Dieser Beutel wird mit 20 ml Hochkonzentrat gefüllt und anschließend wieder vom Ursprungsbeutel durch Verschweißen abgetrennt. Das Thrombozytenkonzentrat wird unter standardisierten Blutbankbedingungen auf einem Agitator horizontal mit elliptischer Bewegungsrichtung (52 U/min) bei einer Raumtemperatur von 22°C maximal 120 Stunden gelagert.

Aus dem Probebeutel, der die 20 ml Thrombozytenhochkonzentrat enthält, wird sofort die erste Probe zur Bestimmung von Thrombozyten-, Leukozyten- und Erythrozytenkonzentration entnommen.

Auch der Probebeutel wird bei Blutbankbedingungen gelagert.

III.4.4 Rheologische Messungen

Zur Bestimmung von rheologischen Parametern werden EK und FFP nach den oben beschriebenen Standardverfahren gewonnen. Dem Erykonzentrat wird als Additivlösung PAGGS-Mannitol zugefügt. Aus einem EK-Beutel, der mehr als 250 ml enthält, werden über einen mit dem SCD steril angeschweißten Beutel am Herstellungstag 50 ml entnommen und vier Wochen unter den vorgeschriebenen Bedingungen gelagert. Ebenso werden ca. 50 ml Frischplasma aus einem stark gefüllten Beutel in einen angeschweißten Satellitenbeutel überführt.

Zur Bestimmung von rheologischen Parametern von EK werden an den Meßtagen aus dem Satellitenbeutel nach vorheriger Homogenisierung der Probe 5 ml EK unter Einhaltung der Sterilität in einer 5 ml-Serum-Monovette (Fa. Sarstedt) entnommen.

Zur Bestimmung von rheologischen Parametern aus FFP werden am Herstellungstag aus dem Satellitenbeutel mit Frischplasma unter Einhaltung der Sterilität fünf 10 ml- Serum-Monovetten (Fa. Sarstedt) aufgezogen. Diese werden in den folgenden vier Wochen ebenso gelagert wie das FFP (-80°C). Zur Bestimmung wird am jeweiligen Meßtag immer nur eine Probe aufgetaut

III.5 Statistik

Zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit der gemessenen Variablen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse für Meßwiederholungen durchgeführt. Unterschreiten eines p-Wertes von 0,05 wurde als signifikant gewertet.

Da alle Stichproben normalverteilt waren (die Prüfung erfolgte mittels Kolmogoroff-Smirnow-Test), wurden sie mit Mittelwert und Standardabweichung beschrieben.

III.6 **Berechnung des Volumens**

Da die einzelnen Stichproben nur gewogen werden konnten, die Richtlinien aber Volumenangaben fordern, mußte eine Umrechnung anhand der Dichte erfolgen.

Dabei gilt für Vollblut eine Dichte von 1,06 g/ml, für Plasma von 1,027 g/ml und für Erythrozyten von 1,096 g/ml [CIBA-GEIGY AG, 1977].

IV Ergebnisse

IV.1 Qualität der Blutprodukte

Die hier erwähnten Richtlinien entstammen dem “Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components”[COUNCIL OF EUROPE, 1992].

Hier werden sich überschneidende Messungen aus den Abschnitten 1 und 2 der Versuchsplanung in gemeinsame Tabellen übernommen. So sind die unterschiedliche Probenzahlen (n) zu erklären.

Tabelle 1: Auswertung Vollblutkonserve

Kenngrößen		**n**	**MW±SD**	**Richtlinien**
Am Herstellungstag				
Beutelvolumen	[ml]	83	548,6±30,2	-
Spendevolumen	[ml]	12	488,9±30,2	450±10%
Hämoglobin	[g/ l]	83	13,4±1,4	-
Hämatokrit	[%]	83	39±4,1	-
Basophile	[%]	71	0,93±1,36	-
Eosinophile	[%]	71	2,17±1,83	-
Stabkernige	[%]	71	4,39±2,94	-
Monozyten	[%]	71	4,76±3,19	-
Lymphozyten	[%]	71	30,1±10,4	-
Segmentkernige				

	[%]	71	55,3±12,2	-
am Ende der Haltbarkeit (28 Tage)				
Hämoglobin	[g/ dl]	12	13,4±1,5	-
freies Hämogl.	[mg/ dl]	12	91,6±42,5	-
Hämatokrit	[%]	12	39,1±4,1	-
Hämolyserate	[%]	12	0,4±0,2	<0,8

85,5% der Proben liegen über der Höchstmarke für das Spendevolumen, nur 12% halten das vorgeschriebene Volumen ein. Nur bei einer Probe ist die Hämolyserate geringfügi>0,8. Bei der Untersuchung auf Hämolysine zeigten 16,6% Hämolysin A und 8,3% Hämolysin B.

Tabelle 2: Auswertung Human-Erythrozytenkonzentrat (buffy-coat-frei)

Kenngrößen		**n**	**MW±SD**	**Richtlinien**
Am Herstellungstag				
Beutelvolumen	[ml]	12	225,4±12,3	250±50
Hämoglobin	[g/ dl]	12	22,3±0,87	-
Hämoglobin	[g/EK]	12	50,26±1,96	>43
Hämatokrit	[%]	12	66,2±1,3	-
Thrombozyten	[x10^9/EK]	12	1,66±0,77	-
Leukozyten	[x10^9/EK]	12	0,50±0,30	≤1,2 bei >75% d. untersuchten Proben
am Ende der Haltbarkeit (35Tage)	[g/ dl]	12	24,0±2,27	
Hämoglobin	[mg/ dl]	12	516±174,8	-
freies Hämogl.	[%]	12	68,8±4,9	-
Hämatokrit	[%]	12	0,65±0,13	-
Hämolyserate				<0,8

8,4% der gemessenen Hämatokrit-Werte liegen etwas unter der gesetzlichen Norm, alle anderen halten sie ein. Ähnlich verhält es sich bei der Leukozyten-Zahl, bei der sich 8,4% über dem Grenzwert befinden. Dieses Überschreiten liegt aber noch im Rahmen des Erlaubten.

In 25% der Fälle überschreitet die Hämolyserate den empfohlenen Wert von 0,8.

Tabelle 3: Auswertung Human-Erythrozytensuspension (buffy-coat-frei in additiver Lösung PAGGS-Mannitol)

Kenngrößen		**n**	**MW±SD**	**Richtlinien**
Am Herstellungstag	[ml]	83	261,6±27,3	-
Beutelvolumen	[g/dl]	83	19,0±2,68	-
Hämoglobin	[g/EK]	83	49,7±7,01	>43
Hämoglobin	[%]	83	54,9±8,4	55-65
Hämatokrit	[x10^9/EK]	83	1,34±1,08	<10
Thrombozyten	[x10^9/EK]	83	0,51±0,46	≤1,2 bei >75% d. untersuchten Proben
Leukozyten	[%]	71	0±0	-
Basophile	[%]	71	0,9±2,42	-
Eosinophile	[%]	71	0,9±2,29	-
Stabkernige	[%]	71	0,14±0,85	-
Monozyten	[%]	71	0,01±0,12	-
Lymphozyten	[%]	71	16,2±32,3	-
Segmentkernige				-
am Ende der Haltbarkeit (49 Tage)	[g/dl]	12	20,1±2,6	
Hämoglobin	[mg/ dl]	12	271,1±113,6	
freies Hämogl.	[%]	12	62,8±7,55	
Hämatokrit	[%]	12	0,52±0,33	
Hämolyserate				-
				-
				-
				<0,8

50,6% der erzielten Hämatokrit-Werte liegen unter der erforderten Mindestmarke von 55%, 1,2% der gemessenen Leukozytenzahlen überschreiten den Normbereich. Die Hämolyse entspricht in 8,4% der Fälle nicht den Richtlinien.

Tabelle 4: Auswertung Human-Erythrozytensuspension (buffy-coat-frei in additiver Lösung ADSOL)

Kenngrößen		**n**	**MW±SD**	**Richtlinien**
Am Herstellungstag				
Beutelvolumen	[ml]	12	263,4±27,0	250±50
Hämoglobin	[g/ dl]	12	18,5±1,76	-
Hämoglobin	[g/EK]	12	48,73±4,64	>43
Hämatokrit	[%]	12	58,8±3,4	55-65
Thrombozyten	[x10^9/EK]	12	1,07±0,62	<10
Leukozyten	[x10^9/EK]	12	0,62±0,30	≤1,2 bei >75 % d. untersuchten Proben
am Ende der Haltbarkeit (49 Tage)				
Hämoglobin	[g/dl]	12	19,1±2,24	-
freies Hämogl.	[mg/ dl]	12	356±199,0	-
Hämatokrit	[%]	12	64,9±4,1	-
Hämolyserate	[%]	12	0,68±0,44	<0,8

Die vorgeschriebene Norm halten 91,6% der Hämatokrit-Werte ein, der Rest befindet sich darunter. Ebenso verhält es sich bei den Leukozytenzahlen, wo 8,4% etwas über der Norm liegen. Die vorgeschriebene maximale Hämolyserate halten nur 83,3% ein.

Tabelle 5: Auswertung Human-Erythrozytensuspension (buffy-coat-frei in additiver Lösung SAG-Mannitol)

Kenngrößen		**n**	**MW±SD**	**Richtlinien**
Am Herstellungstag				
Beutelvolumen	[ml]	12	265,1±21,4	-
Hämoglobin	[g/ l]	12	20,1±0,72	-
Hämoglobin	[g/EK]	12	53,3±1,91	>43
Hämatokrit	[%]	12	60,1±2,28	55-65
Thrombozyten	[x10^9/EK]	12	1,20±1,47	<10
Leukozyten	[x10^9/EK]	12	0,27±0,33	≤1,2 bei >75% d. untersuchten Proben
am Ende der Haltbarkeit (42 Tage)				
Hämoglobin	[g/ dl]	12	20,0±1,3	-
freies Hämogl.	[mg/ dl]	12	223,0±71,0	-
Hämatokrit	[%]	12	65,7±3,7	-
Hämolyserate	[%]	12	0,38±0,11	<0,8

8,4% der Leukozytenzahlen sind höher, als es die EU-Kommission empfiehlt.

Tabelle 6: Auswertung Gefiltertes Human-Erythrozytenkonzentrat

Kenngrößen		**n**	**MW±SD**	**Richtlinien**
Am Herstellungstag				
Beutelvolumen	[ml]	83	231,4±28,7	-
Hämoglobin	[g/ l]	83	18,9±1,5	-
Hämoglobin	[g/EK]	83	43,7±3,47	>40
Hämatokrit	[%]	83	54,2±4,2	-
Thrombozyten	[x10^9/ EK]	83	0,89±0,88	-
Leukozyten	[x10^9/ EK]	12	0,07±0,26	<5,0 bei ≥90% d.untersuchten Proben (Kammerzählverfahren)
Erythrozytenverlust	[%]	83	6,36±5,16	-
am Ende der Haltbarkeit (49 Tage)				
Hämoglobin	[g/ dl]	12	18,8±1,54	-
freies Hämog.	[mg/ dl]	12	240,6±81,6	-
Hämatokrit	[%]	12	59,9±4,51	-
Hämolyserate	[%]	12	0,50±0,12	<0,8 untersuchten Proben

Nach der Filterung entsprechen über 91% der Leukozytenzahlen der Norm, ebenso entspricht der Erythrozytenverlust in 85,5% der Fälle den Vorschriften.

Tabelle 7: Auswertung Tiefkühlkonserviertes Human-Erythrozytenkonzentrat

Kenngröße n		**N**	**MW±SD**	**Richtlinien**
Nach dem Auftauen				
Beutelvolumen	[ml]	12	191,4±22,3	>185
Hb-Überstand	[g/ l]	12	0,19±0,02	<0,2
Gesamt-Hb	[g]	12	35,1±3,44	≥36
Hämatokrit	[%]	12	68,4±2,58	70±5
Osmolarität	[mOsmsol]	12	328±15,9	340
Kryoprotektiv. vor Waschen	[g/ kg]	12	174,4±16,5	-
Kryoprotektiv. nach Waschen	[g/ kg]	12	2,64±0,95	-
Leukozyten	[x10^9/EK]	12	0,008±0,03	<0,1 bei >75% d. untersuchten Proben

Das Volumen der kryokonservierten EK liegt in 83,8% über dem geforderten Mindestmaß, auch befinden sich 83,8% der Hb-Überstände unter der Höchstmarke. Nur 41,6% der gemessenen Werte bei Gesamt-Hb erfüllen die gesetzlichen Vorschriften, während die Hämatokrit-Werte zu 91,6% im erforderlichen Bereich sind. Alle Proben sind steril.

Tabelle 8: Auswertung Thrombozytenkonzentrat (aus Einzelspende)

Kenngrößen		**N**	**MW±SD**	**Richtlinien**
Am Herstellungstag	[ml]	12	56,2±15,6	50-60
Beutelvolumen	[x10^9/TK]	12	92,6±34,1	45-85
Thrombozyten	[x10^3/µl]	12	1643,9±664,9	-
Thrombozyten -Konz		12		0,05-1
Leukozyten	[x10^9/TK]	12	0,06±0,04	0,2-1
Erythrozyten			0,006±0,004	
am Ende der Haltbarkeit (5 Tage)	[x10^9/TK]	12		6,0-7,4
pH-Wert	-		7,37±0,07	

25% der Volumina liegen unterhalb des Limits von 50ml, den vorgeschriebenen pH-Wert halten 33,3% der Proben nicht ein.

Tabelle 9: Auswertung Thrombozytapherese

Kenngrößen		**N**	**MW±SD**	**Richtlinien**
Am Herstellungstag	[ml]	12	250,0±0	-
Beutelvolumen	[x10^9/TK]	12	281,5±54,6	>240
Thrombozyten	[x10^3/µl]	12	1123,7±216,5	-
Thrombozyten-Konz.		12		≤0,2
Leukozyten	[x10^9/TK]	12	0,05±0,04	-
Erythrozyten			0,02±0,006	
am Ende der Haltbarkeit (5 Tage)	[x10^9/TK]	12		6,0-7,4
pH-Wert	-		7,1±0,14	

Alle Werte entsprechen den Vorschriften.

Tabelle 10: Auswertung Fresh Frozen Plasma

Kenngrößen		**N**	**MW±SD**	**Richtlinien**
Am Herstellungstag				
Beutelvolumen	[ml]	71	297,4±26,6	-
Hämoglobin	[g/ l]	71	0,075±0,05	-
Thromboz.	[x10^9/l]	71	20,2±8,05	<50
Leukozyten	[x10^9/l]	71	0,056±0,05	<0,1
Erythrozyten	[x10^9/l]	71	7,0±7,0	<6,0
Nach dem Auftauen				
Faktor-V-Gehalt	[%]	71	107,5±36,8	-
Faktor-VIII-Ge.	[%]	71	104,6±37,2	>70 d. Ausgangswertes
Gesamteiweiß	[%]	71	6,0±0,32	-

39,4% der gemessenen Erythrozytenzahlen liegen unterhalb der Höchstmarke von 6,0, die übrigen z.T. deutlich darüber.

In etwa 7 % der Fälle entspricht der Faktor-VIII-Gehalt nicht den Vorschriften.

IV.2 Funktionelle Parameter

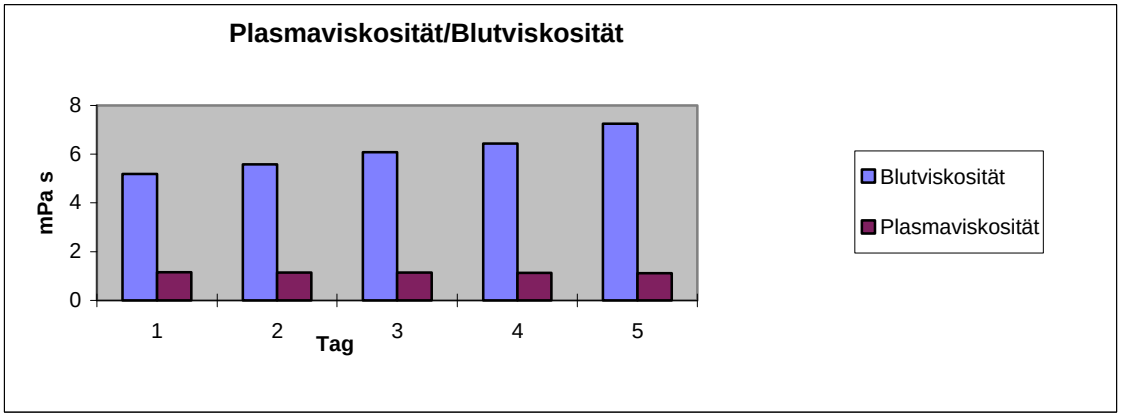

Abb. 1: Der Hämatokrit der Erythrozytenkonzentrate, gemessen mit dem Sysmex von Digitana, erhöht sich um 5,7%. Diese Änderung ist signifikant mit $p<0,05$. Die Veränderung des Hämatokrits gemessen mit einer Mikrohämatokrit-Zentrifuge ist weit weniger deutlich, nämlich nur um 0,63%. Diese Erhöhung ist nicht signifikant.

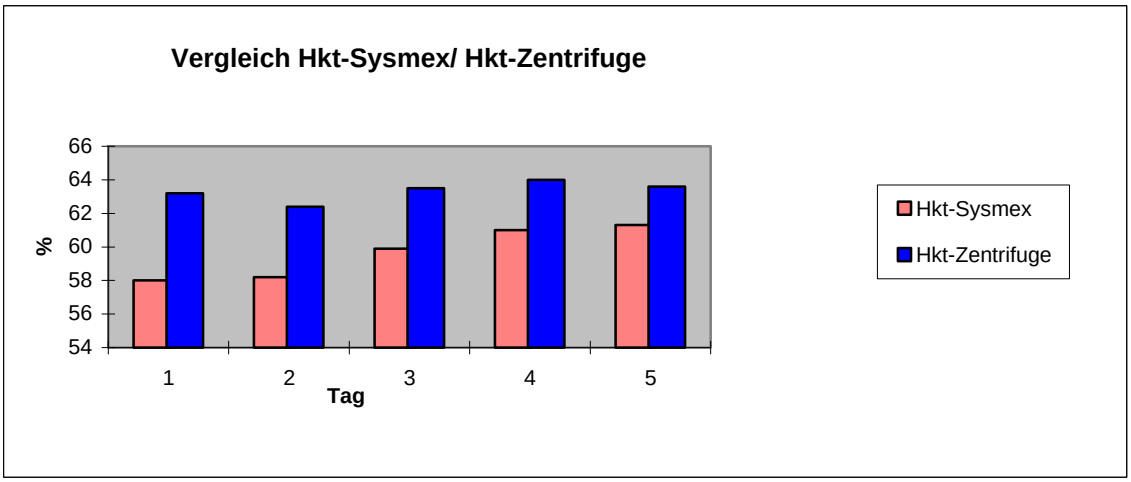

Abb. 2: Die Plasmaviskositätssteigerung um 3,45% ist nicht signifikant. Die Zunahme der Viskosität der Erythrozytenkonzentrate von 5,18 auf 7,25 mPa.s ist signifikant ($p<0,05$) und entspricht einer Erniedrigung der Fließfähigkeit von fast 40%.

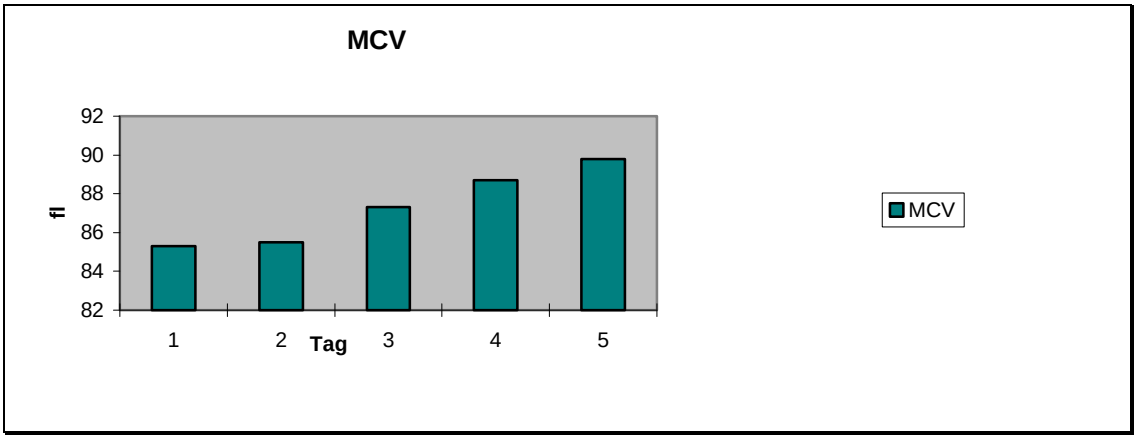

Abb. 3: Das mittlere Zellvolumen MCV verändert sich um 5,3%. Diese Zunahme ist aber dennoch signifikant ($p<0,05$).

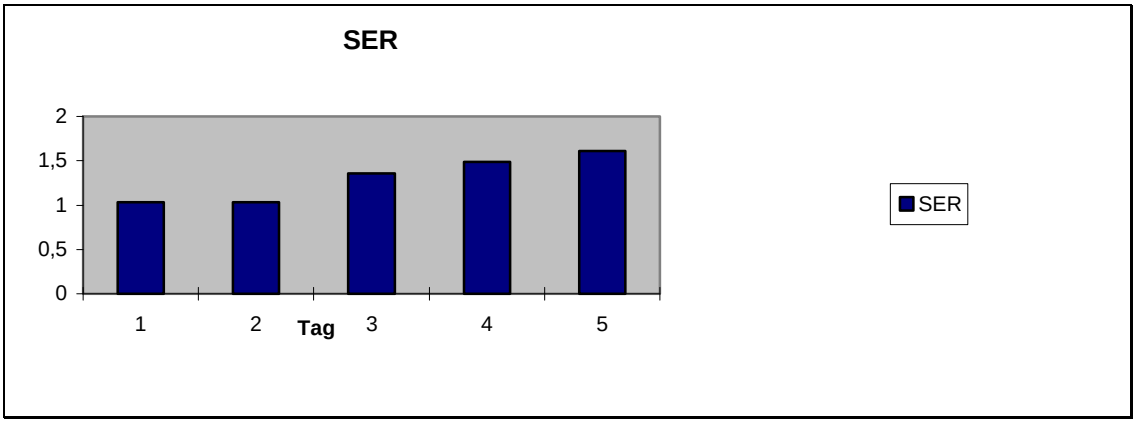

Abb. 4: Die Erythrozytenrigidität SER nimmt innerhalb von vier Wochen Lagerungszeit um 56,3% zu, diese Änderung ist signifikant ($p<0,05$).

Die Zahl der Leukozyten sinkt signifikant ($p<0,05$). Es wird eine Abnahme von 33,6% ermittelt.

Die Zahl der Thrombozyten steigt signifikant um 207%. Dabei ist zu beachten, daß durch den elektronischen Zellzähler Sysmex auch Bruchstücke als Thrombozyten gezählt werden.

Die Änderung der Erythrozytenzahl um nur 0,3% ist nicht signifikant.

Eine tabellarische Übersicht über die Ergebnisse der rheologischen Untersuchungen befindet sich im Anhang (Punkt X).

V Diskussion

V.1 Vollblut

Bei vielen Autoren wird die Vollblutkonserve schon seit einiger Zeit als obsolet bezeichnet, da diese Art der Darreichung aus medizinischen und ökonomischen Gründen keinen Bestand mehr hat [BERGMANN, 1980]. Trotzdem soll hier noch einmal kurz auf diese Art der Erythrozytenpräparation eingegangen werden, vor allem als Ausgangspunkt für daraus gewonnene Blutprodukte.

Wichtig für die aus Vollblut gewonnenen Folgeprodukte ist das Spendevolumen. 85,5% der 83 untersuchten Proben lagen über dem von der EU-Kommission vorgeschlagenen Wert. Die Beendigung der Spende erfolgte wegen technischer Schwierigkeiten nicht exakt. Laut einer Studie von BUTTON, ORLINA, KEVY und JOSEPHSON [1976] ist bis zu einer Höchstmarke von 550g bzw. ml die Qualität der Vollblutkonserve noch akzeptabel, gemessen an Erythrozytenüberlebenszeit, 2,3-DPG-Spiegel, ATP-Gehalt und verschiedenen hämatologischen Parametern. Dieser Wert wird bei den untersuchten Blutspenden in keinem Fall überschritten.

Alle anderen gemessenen Werte liegen sowohl im Rahmen der von der EG erstellten Richtlinien als auch im medizinischen Normbereich.

Die Verarbeitung der Vollblutkonserve erfolgte innerhalb 1-3 Stunden nach der Abnahme; dieser Zeitraum wird von verschiedenen Autoren für angemessen erachtet [MISTEREK, 1990;KRETSCHMER, 1990]. Andere [PIETERSZ, 1989; PIETERSZ, 1990] bevorzugen eine rasche Abkühlung des Vollblutes und/oder eine bis zu 24-stündige Lagerung [PIETERSZ, 1989] vor der Separation.

Nach Beheben der Schwierigkeiten bei der exakten Einhalten der Füllmenge konnte im Anschluß an den Zeitraum der Datengewinnung ein genaues Übereinstimmung mit der geforderten Menge erreicht werden. Wegen des Abweichens eines großen Teils der untersuchten Proben vom Richtwert muß die Qualität der Vollblutspende aber als nicht ausreichend angesehen werden.

V.2 Humanerythrozytenkonzentrat (buffy-coat-frei)

Vor der Einführung der Additivlösungen wurde den EKs nur ein Stabilisator zugefügt. Damit kann man für 35 Tage das Überleben und die Funktionsfähigkeit der meisten Erythrozyten garantieren.

Dieser Stabilisator, $CPDA_1$, wird auch heute noch verwendet, besonders wenn die Blutspende für die Transfusion von Kindern erfolgt. Einzelne Bestandteile in den additiven Lösungen scheinen für Säuglinge und Kleinkinder schlecht verträglich zu sein. Die genauen Zusammenhänge sind aber noch nicht bekannt.

Die untersuchten Parameter stimmen zum größten Teil mit den Richtlinien überein; auch die Hämolyserate liegt mit 0,65% im Bereich der Vorschriften. Doch im Vergleich zu den Ergebnissen der EK in additiver Lösung wird deutlich, daß trotz z.T. deutlich längerer Lagerungszeit die letztgenannten im Verhältnis geringere Hämolyse zeigen.

Unterschiedliche Studien [KRETSCHMER, 1990;DAWSON, 1975] zeigen, daß in CPDA-1 gelagerte Erythrozyten auch noch länger als 35 Tage größtenteils gut überleben, besonders wenn hohe Glukosekonzentrationen beigegeben waren. Auf hohen Glukosemengen basieren auch weitere CPD-Derivate, CPDA-2 und CPDA-3. In einem Experiment [BEUTLER, 1983] konnte mit CPDA-2 sogar noch nach 49 Tagen eine zufriedenstellende Überlebensfähigkeit erreicht werden.

Die hier aufgeführten Ergebnisse zeigen, daß die im Blutspendedienst der Abteilung für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin produzierten EK ohne additive Lösung die Richtwerte großteils einhalten, dennoch wäre eine möglichst kurze Lagerungszeit, d.h. kürzer als die Richtlinien vorschlagen, aufgrund der grenzwertig hohen Hämolyserate zu empfehlen. Ein solches Abweichen von der Norm ist sicher nicht zu tolerieren, auch hier konnte für die Zukunft eine Besserung erreicht werden, wie spätere Qualitätskontrollen zeigen.

V.3 Humanerythrozytenkonzentrat in additiver Lösung (buffy-coat-frei)

Eine große Zahl von Studien beschäftigen sich mit je einem der drei am häufigsten verwendeten Additiva - SAG-Mannitol, PAGGS-Mannitol und ADSOL - und ihren Vor- und Nachteilen [z.B. BERGMANN, 1991; KRETSCHMER,1988; PIETERSZ, 1990]. Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Studie alle drei Zusatzstoffe gleichen Untersuchungen unterzogen; damit ist ein Vergleich der verschiedenen Präparate möglich.

Die Vorteile der Additivlösungen sind offensichtlich: Das EK wird verdünnt und besitzt deshalb, im Gegensatz zu “reinem” EK, verbesserte Fließeigenschaften und kann so schnell wie Vollblut transfundiert werden. Außerdem werden die Erythrozyten während der Lagerungszeit mit Nährstoffen und Stabilisatoren versorgt, so daß die Lagerungsdauer z.T. bis auf sieben Wochen ausgedehnt werden kann [ÅKERBLOM, 1990]. Die Verlängerung der Lagerungszeit ist vor allem sinnvoll, da dann eine geringere Anzahl an Blutspenden verfällt.

Unterschiede zwischen den einzelnen Additiva bestehen in bezug auf Lagerungsdauer und Zusammensetzung. Bei ADSOL handelt es sich um eine Weiterentwicklung von SAG-M, die seit einigen Jahren Verwendung findet.

Da alle Erythrozytenkonzentrate nach identischen Methoden gewonnen und identischem Verhältnis Additiv : Vollblut hergestellt werden, sind keine gravierenden Unterschiede bezüglich Zellkontamination, Volumen und Hämatokrit zu erwarten. Mit moderner Technik, z.B. automatischen Zellseparatoren und Materialien, sind bei sachgemäßer Handhabung Produkte mit hervorragender Qualität leicht zu erreichen. So ist die Leukozyten- und Thrombozytenverunreinigung bei Beutelsystemen mit Oben- und Untenabgang deutlich niedriger als bei konventionellen Mehrfachbeuteln [PIETERSZ, 1990]. Es existieren zwei verschiedene automatische Pressen, die sich nur geringfügig unterscheiden in bezug auf Reinheit der Endprodukte [ÅKERBLOM, 1990].

Das Leukozyten-Differentialblutbild, das bei 72 EK in PAGGS-M angefertigt wurde, zeigt, daß nach Separation hauptsächlich segmentkernige Granulozyten und eosinophile Zellen (fast alle zerstört) im Ausstrich zu finden waren. Als Ursache hierfür wird die ähnliche Dichte von Erythrozyten und Granulozyten angesehen.

Der mittlere Hämatokrit der in Homburg produzierten EK liegt leicht unter der Norm und auch unter dem vergleichbarer Studien [BERGMANN, 1991; KRETSCHMER, 1988; PIETERSZ, 1990]. Möglicherweise ist eine Meßungenauigkeit des elektronischen Zellzählers als Ursache denkbar: Dieser berechnet verschiedene Werte wie Hämatokrit, mittlerer Hb-Gehalt des Einzelerythrozyten (MCH) und mittlere korpuskuläre Hb-Konzentration (MCHC) anhand der Zellgröße, und da die Erythrozyten direkt nach Separation Stechapfelform annehmen (wie im Ausstrich erkennbar), ist hier der Fehler zu suchen. Der mit einer Mikrohämatokrit-Zentrifuge erhaltene Wert konnte bei der rheologischen Untersuchung direkt mit dem automatisch

gewonnenen Wert verglichen werden; es zeigten sich bei der Zentrifugen-Messung meist deutlich höhere Werte (s. Rheologie).

Am Ende der Haltbarkeit zeigten sich keine gravierenden Unterschiede zwischen den verwendeten Additiva; zwischen 83 und 100% der Hämolyseraten liegen im Rahmen der Normen. In anderen Untersuchungen wurden andere Indikatoren für die Haltbarkeit untersucht, meist ATP und 2,3-DPG. Bei WALKER [1987] zeigen beide Parameter günstigere Werte für PAGGS-M als für SAG-M, allerdings z.T. nach 49 Tagen, d.h. für SAG-M zu langer Lagerungsdauer. Die meisten Studien beschränken sich aber auf eine Additivlösung oder den Vergleich mit CPDA-1, so daß ein "optimales " Additiv nicht genannt werden kann.

Das neueste Additiv ist ADSOL, und mehrere Untersuchungen [NOEL, 1988;HEATON, 1984] wurden durchgeführt, die für die gute Verträglichkeit und hohe in-vivo-Überlebensrate der Erythrozyten sprechen. Ähnliche Untersuchungen existieren aber auch für PAGGS-M [WALKER, 1987;WALKER, 1990] und SAG-M [STRAUSS, 1987;HÖGMANN,1983], und so ist es eine rein wirtschaftliche Frage, auf welchen Zusatzstoff die Wahl fällt.

Bei einem Vergleich (s. unten) der Additiva fällt vor allem der deutlich höhere Glukose- und sehr viel geringere Kochsalzgehalt von ADSOL auf.

Inhaltsstoffe [mg]	**PAGGS-M [mg]**	**SAG-M [mg]**	**ADSOL [mg]**
Glukose-Monohydrat	940	900	2200
Adenin	25	21,5	34,3
Mannitol	1000	525	751
NaCl	421	877	90

Bis auf das Abweichen eines großen Anteils der untersuchten Proben vom vorgeschriebenen Hämatokrit waren die Ergebnisse der übrigen Parameter zufriedenstellend.

Zusammenfassend ist jedoch eine solch gravierende Abweichung auch nur eines Parameters nicht zu dulden und deutlich qualitätsmindernd.

V.4 Gefiltertes Humanerythrozyten-Konzentrat

Obwohl bei modernen Separationsverfahren, die auch in der Abteilung für klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin in Homburg/Saar eingesetzt werden, mehr als 85% der Leukozyten aus dem EK entfernt werden, sind doch Risiken mit den verbleibenden Leukozyten verbunden.

Der Grund für die häufig auftretende febrile nicht-hämolytische Transfusionsreaktion ist eine Immunisierung gegen HLA-Klasse I-Antigene. Diese kann nur durch Zellen ausgelöst werden, die gleichzeitig HLA-Klasse I und II exprimieren. In Blutkonserven sind das Leukozyten und dort wiederum nur antigenpräsentierende Zellen. Diese sind in der Lage, CD4-Helferzellen zu aktivieren, die bei der Immunabwehr bis auf einige Ausnahmen für die humorale und zytotoxische Antwort gegen fremde Antigene unabdinglich sind. Transfundierte Leukozyten können mit den CD4-Helferzellen direkt reagieren, sie aktivieren und so eine Immunantwort auslösen [BUTZ, 1994]. Außerdem sind transfusionsbedingte Immunsuppression mit möglicher Rezidivratenerhöhung bei Tumorpatienten und Übertragung bzw. Reaktivierung von Viren beschrieben worden [BUTZ, 1992].

In vielen Untersuchungen wurde deutlich, daß nur durch Unterschreiten einer bestimmten Menge von Leukozyten eine Immunisierung gegen HLA-Antigene vermieden werden kann. Dieser CILL-Wert (critical immunologic load of leucocytes) liegt im Bereich von $5x10^6$ Leukozyten pro Einheit. Der von der EG-Kommission vorgeschlagene Wert entspricht diesem, es werden aber auch z. T. $1x10^6$/Einheit vorgeschlagen.

Durch Entfernung des Buffy-Coats sind Leukozytenzahlen von etwa $5x10^8$/EK möglich, eine weitere Reduktion ist am effektivsten mit Hilfe eines Filters zu erreichen. In der vorliegenden Studie wurde mit dem BPF4B der Fa. PALL (Dreieich) gearbeitet. Hierbei handelt es sich um ein Filtersystem aus Polyester und Acrylpolymer (PMMA) zur Entfernung von Leukozyten, Thrombozyten und Mikroaggregaten. Durchschnittlich wurde damit eine Leukozytenzahl von $0{,}07x10^6$ pro Beutel erreicht. Dieser Wert liegt sowohl unterhalb des CILL-Wertes als auch im Bereich der EG-Normen. Auch bei anderen Autoren wurden mit verschiedenen Filtern der Fa. PALL vergleichbare Ergebnisse erzielt [KOERNER, 1991; PIETERSZ, 1992;MASSE, 1991].

Nur der bei PIETERSZ [1992] verwendete Cellselect erreichte Werte, die noch weiter unter dem

CILL-Wert lagen. Trotzdem zog auch PIETERSZ den PALL-Filter den anderen getesteten wegen des geringeren Arbeitsaufwandes und der höheren Filtrationsgeschwindgkeit vor. Mit dem hier verwendeten BPF4B konnte ein EK innerhalb von 10 min. gefiltert werden.

Die Zählung der verbliebenen Leukozyten wurde manuell mit Hilfe der Nageotte-Kammer durchgeführt, bei der das untersuchte Blutvolumen relativ groß ist. Auch BEAUJEAN [1992], MASSE [1991] und DZIK [1993] verwendeten die Nageotte-Kammer. DIETRICH [1992] vergleicht die Ergebnisse der Nageotte-Kammer mit der Neubauer-Kammer und kommt, wie auch PIETERSZ [1994] zu dem Schluß, daß die mit der Nageotte-Kammer erzielten Werte sehr viel genauer waren. Bei anderen Studien werden immunologische [WESTER, 1989] und elektronische Methoden [STENEKER, 1992] favorisiert. Alle Autoren sind sich einig, daß die Kombination von Buffy-Coat-Entfernung und Filtration am effektivsten zur Reduktion der Leukozyten auf ein Minimum ist.

Ein weiteres Kriterium für die Qualität eines Filtersystems ist der Erythrozytenverlust, der 10% nicht überschreiten sollte. Auch hier liegen die Produkte der Abteilung für klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universität des Saarlandes meist im von der EG vorgegebenen Normbereich und häufig unter den bei anderen Autoren erzielten Werten [PIETERSZ, 1994; MASSE, 1991]. Der Grund für diesen niedrigen Wert ist sicher in der Entlüftung des Filtersystems nach erfolgter Filterung zu suchen, bei der noch einige Milliliter Blut aus dem Filter in den Auffangbeutel laufen.

Für die Qualität der in Homburg gefilterten EK spricht sicher auch die vergleichsweise niedrige Hämolyserate nach Ablauf der Haltbarkeit, die entsprechend der zugefügten Additivlösung PAGGS-M 49 Tage beträgt. Sie ist mit 0,50% niedriger als die in PAGGS-M und ADSOL gelagerten ungefilterten EK.

V.5 Tiefkühlkonserviertes Erythrozytenkonzentrat

Die konventionelle Lagerung von EK ist bei Verwendung des Stabilisators CPDA-1 auf 35 Tage, bei Zugabe einer Additivlösung (z.B. PAGGS-M) auf 49 Tage begrenzt. Bereits innerhalb dieses Zeitraumes ist eine Qualitätseinbuße der Blutprodukte meßbar. Durch Tiefkühlkonservierung ist es möglich, Erythrozyten sehr lange Zeit zu lagern. Dies ist besonders bei seltenen Blutgruppen sinnvoll. Auch um Engpässe in der Versorgung zu vermeiden, z.B. bei Katastrophen, wäre eine

Bevorratung mit tiefgekühlten EK günstig [SPUTTEK, 1992]. Da zur Tieffrierung aber Kühl- und Erwärmungsraten von mehreren 1000ºC/min erforderlich wären [KÖRBER, 1987], die praktisch nicht zu erzielen sind, werden dem EK Gefrierschutzadditive beigefügt, die nur max. einige 100ºC/min benötigen [SPUTTEK, 1993].

Sehr weit verbreitet ist das Glyzerol, das auch in der Abteilung für klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universität des Saarlandes zum Einsatz kam. Weiterhin werden DMSO und HES verwendet. Letzteres bietet den Vorteil, wegen seiner makromolekularen Struktur nicht in die Erythrozyten einzudringen und dabei zu hämolysieren. Außerdem hat es, im Gegensatz zu DMSO, keine toxische Wirkung auf die Zellen. Ein mit HES eingefrorenes EK kann also nach dem Auftauen direkt transfundiert werden und muß nicht in einem zeit- und arbeitsaufwendigen Verfahren gewaschen werden [SPUTTEK, 1993]. Die Erfahrungen mit HES in vivo sind aber noch unvollständig, eine abschließende Beurteilung steht noch aus.

Die meiste Erfahrung hat man mit Glyzerol, das vor allem in den USA verwendet wird. Die in Europa am häufigsten verwendete Technik “low gycerol - rapid freezing” kommt auch in dieser Untersuchung zum Einsatz. Durch Zufügen einer Erythrozyten-Tieffrierlösung (BIOTRANS, Dreieich) wird eine Glyzerol-Konzentration von etwa 18% erreicht und bei -196°C in flüssigem Stickstoff schockgefroren [Einfriervorschrift]. Dieses Verfahren ist sehr einfach und, bis auf die Bereitstellung von flüssigem Stickstoff, an keinerlei aufwendiges Gerät gebunden. In der Dampfphase des Stickstoffes können die EK laut UMLAS [1991] siebzehn und mehr Jahre gelagert werden, ohne daß unverhältnismäßig viele Erythrozyten zerstört werden. Meist erst beim Auftauen kommt es zur Hämolyse, was durch ein osmotisches Ungleichgewicht zwischen Erythrozyteninnerem und Umgebung nach Eindringen von Glyzerol erklärbar ist. Das ist auch der Grund für das relativ niedrige Gesamt-Hämoglobin und geringe Volumen des gewaschenen Produktes. Laut Auftauvorschrift muß solange weiter gewaschen werden, bis der Überstand nicht mehr hämolytisch erscheint. Da aber die Zellen auch nur beschränkt oft dem Streß des Zentrifugierens ausgesetzt werden können, wurde maximal viermal gewaschen, auch wenn anschließend noch Hämolyse erkennbar war. Trotzdem waren die Waschvorgänge ausreichend, um die Gesamt-Glyzerinkonzentration auf 2% zu senken. Das reicht aus, um die in vivo Überlebensrate der Erythrozyten in einem angemessenen Rahmen zu halten. Um die Hämolyse auf ein Minimum zu beschränken, ist auch ein besonders niedriger Hämatokrit nützlich. PEGG [1981] konnte zeigen, daß bei einem Hämatokrit unter 20% auch eine Hämolyse unter 1% erreichbar war.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch NEI [1981], der den Schaden an den Erythrozyten elektronenmikroskopisch untersuchte.

Durch häufiges Waschen sank der Hb-Gehalt unter den vorgeschlagenen Minimalwert, wobei diese Grenze nur knapp unterschritten wurde. Bei besonders vorsichtigem Auftauen kann die Zahl der Waschgänge begrenzt werden und somit eine komplette Entfernung des hämolytischen Überstandes erreicht werden.

Dennoch sind diese Ergebnisse zufriedenstellend, obwohl die Herstellung mit großem Arbeitsaufwand verbunden ist. Die Tiefkühlkonservierung mit HES würde durch das Wegfallen des Waschens erhebliche Vorteile bieten.

Ein weiteres Problem bei der Herstellung von tiefgefrorenen EK bzw. dem anschließenden Auftauvorgang ist die Tatsache, daß der Originalblutbeutel mehrmals durch Dornen der Überleitungsbestecke angestochen werden muß, um das Gefrierschutzadditiv zuzufügen oder wieder zu entfernen. Selbst unter Verwendung eines „Sterile docking“-Gerätes wird doch das System mehrmals angestochen und wieder verschlossen. Es liegt somit kein geschlossenes Beutelsystem mehr vor. Das bedeutet, daß die EG-GMP-Leitlinien steriler Produkte Anwendung finden. Gemäß dieser Richtlinien muß die Herstellung dann auf einer Sterilbank mit laminarem Luftstrom in einem speziellen Reinraum (Reinheitsklasse A in B) erfolgen. Die notwendigen technischen Voraussetzungen sind somit immens.

Wegen der Probleme hinsichtlich Arbeitsaufwand und geforderter Qualität wurde dieses Verfahren bisher noch nicht in das Programm des Blutspendedienstes der Abteilung für klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universität des Saarlandes aufgenommen.

V.6 Thrombozytenpräparation

a) aus einer Einzelspende

Bis heute werden in vielen Blutspendezentren die Buffy-Coats verworfen, obwohl sich in ihnen große Mengen an Plättchen befinden. Auch in der Abteilung für klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universität des Saarlandes wurden für diese Studie nur kurzzeitig Plättchenkonzentrate aus den Buffy-Coats gewonnen, die sehr ermutigende Ergebnisse erbrachten.

Die Thrombozytengewinnung aus der Einzelspende ist arbeitsintensiver als die Thrombapherese, erlaubt aber ein effizienteres Ausnutzen einer Vollblutspende. Andererseits wird die größere mechanische Belastung durch den zusätzlichen Zentrifugationsschritt in einer anderen Untersuchung [SÖHNGEN, 1988] als Ursache für schlechtere Morphologie und Funktion im Vergleich zu anderen Methoden der Thrombozytengewinnung gesehen. Die hier verwendeten Beutelsysteme mit Oben- und Untenabgang gestatten es, den Buffy-Coat nach der Separation von EK und Plasma ruhen zu lassen, ohne ihn in einen Extrabeutel transferieren zu müssen. Ein Problem bei der anschließenden zweiten Zentrifugation ist das geringe Volumen - es müssen Spezial-Zentrifugenbecher und -Klemmen verwendet werden. Anderenorts werden die Buffy-Coats mit Plasma o.ä. resuspendiert [KRETSCHMER, 1988] oder auch gepoolt [PIETERSZ, 1990], was den späteren Umgang sehr erleichtert.

Nach der Zentrifugation werden die überstehenden Thrombozyten in einen Spezialbeutel überführt, und auch hier zeigt sich ein Nachteil des kleinen Volumens: in Aussackungen und Falten bleiben viele Zellen in der Ruhephase und bei der Zentrifugation hängen, die bei der automatischen und später der manuellen Separation zu Verunreinigung führen. In allen anderen Studien konnte eine Leukozytenzahl von bis zu $0{,}1 \times 10^8$ pro Beutel [KRETSCHMER, 1988] erreicht werden; der Mittelwert der in der Abteilung für klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universität des Saarlandes produzierten Thrombozytenkonzentrate ist sechsmal größer, aber trotzdem noch weit unter dem gesetzlichen Wert. Bei MISTEREK [1990] wird der Buffy-Coat, um "Faltenbildung und Einsacken des Beutels im Zentrifugenbecher, die zu unerwünschten Zellkontamination führen können" zu vermeiden, in einen kleinen 150ml-Beutel überführt.

Alle anderen hier gemessenen Zellzahlen sind sehr gut, besonders die der Thrombozyten. $92{,}6 \times 10^9$ pro Beutel sind etwa um 30% mehr als alle anderen Autoren, die durchschnittlich 67×10^9 pro Beutel erreichten. Auch die Erythrozytenkontamination ist sehr gering.

Für die Haltbarkeit von fünf Tagen ist das Beutelmaterial, in dem das Plättchenkonzentrat gelagert wird, von großer Wichtigkeit. Es muß eine gute Gasdiffusionskapazität besitzen [PIETERS, 1992], denn während der Beutel bewegt wird, "diffundieren der benötigte Sauerstoff und die entstandene Kohlensäure durch die Beutelfolie" [PIETERS, 1992]. Als Maß für die Qualität nach Ablauf der Haltbarkeit galt hier der pH-Wert, der am oberen Rand der Richtwerte und nur wenig unter dem physiologischen lag. Das ist eher das Gegenteil dessen, was man bei der hohen Kontamination mit

Leukozyten erwarten würde, denn PIETERSZ meint, daß die ausgeprägte Stoffwechselaktivität der Leukozyten einen pH-Abfall erklären würde.

KRETSCHMER [1988] konnte zeigen, daß auch nach fünf Tagen die Funktion der Thrombozyten recht gut ist; die Schäden bei aus Buffy-coat gewonnenen Plättchen-Konzentraten waren sehr viel geringer als bei aus plättchenreichem Plasma gewonnenen [KRETSCHMER, 1990].

Die guten Ergebnisse zeigen, daß auch im Blutspendedienst der Abteilung für klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universität des Saarlandes die Gewinnung von Plättchenkonzentraten aus Einzelspenden ohne großen finanziellen, aber erheblichen zeitlichen Aufwand durchführbar ist.

b)mittels Thrombapherese

Die Thrombozytenspende ist ein Verfahren, das in der Abteilung für klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universität des Saarlandes schon seit einiger Zeit mit großem Erfolg praktiziert wird. Die beiden Separatoren erbringen hinsichtlich Thrombozytenzahl und Überlebenszeit der Zellen vergleichbare, zufriedenstellende Ergebnisse [MOOG,1990], wobei der CS-3000 Plus von Baxter mit einer peristaltischen und der AS-104 von Fresenius mit einer Schlauchrollenpumpe arbeitet. In der vorliegenden Arbeit wird kein Unterschied zwischen den beiden Geräten gemacht.

Das Volumen ist auf 250ml eingestellt. Dieses relative hohe Volumen erleichtert die Lagerung und Weiterverwendung deutlich, wie die Probleme bei der Thrombozytengewinnung aus einer Einzelspende zeigten.

Hinsichtlich Zellkontamination sind die Ergebnisse sehr zufriedenstellen. Auch der pH-Wert, der bei der Thrombozytengewinnung aus einer Einzelspende am oberen Rand der Skala liegt, ist mit 7,1 befriedigend. Laut einer Untersuchung von SÖHNGEN [1987] ist schon nach drei Tagen Lagerungszeit mit erheblichen Funktionseinbußen der Thrombozyten zu rechnen. Trotzdem ist der pH-Wert, der hier als einziger über den Stoffwechsel Aufschluß gibt, nach 5 Tagen noch sehr gut.

Für thrombozytopenische Patienten können mit den beiden hier erwähnten Verfahren zur Thrombozytengewinnung Hochkonzentrate hergestellt werden. Die Thrombapherese ist für den Spender erheblich schonender, da Flüssigkeit, Erythrozyten und Leukozyten wieder retransfundiert

werden und so der Eisenverlust gering bleibt. Für den Empfänger bedeutet es eine geringere Zahl an Einzelspenden und damit ein geringeres Infektionsrisiko und eine geringere Immunisierungsrate.

Insgesamt kann die Qualität der Thrombozytenhochkonzentrate durch Thrombapherese als gut bezeichnet werden, denn alle geforderten Parameter genügen den Richtlinien.

V.7 Plasma

Plasma hat eine große Bedeutung zur Substitution bei Gerinnungsfaktor-Mangel und zur Gewinnung von Faktoren-Konzentraten. Dabei ist besonders der Bedarf an Faktor VIII zur Therapie von Hämophilie A-Patienten in den letzten Jahren stark angestiegen.

Für die Qualität von Plasma, meist Fresh Frozen Plasma, ist ein möglichst hoher Gehalt an Gerinnungsfaktoren und eine niedrige Verunreinigung mit anderen Blutbestandteilen ausschlaggebend.

Üblicherweise wird das Plasma beim Separationsvorgang mit der automatischen Presse in einen Extrabeutel abgepreßt; dabei wird der Buffy-Coat und damit der größte Teil der Thrombozyten und Leukozyten vom Plasma entfernt. Im Mittel sind in den hier untersuchten Konserven nur mehr $20{,}2 \times 10^9$ Thrombozyten und $0{,}056 \times 10^9$ Leukozyten enthalten. Beide Werte liegen geringfügig unterhalb der von der EU-Kommission vorgeschlagenen Richtwerte.

Nur die Erythrozytenkontamination ist im Mittel höher als zulässig. Auch BERGMANN [1991] konnte diesbezüglich ein nur begrenzt zufriedenstellendes Ergebnis erzielen, wenngleich er hinsichtlich Verunreinigung mit sowohl Leukozyten als auch Erythrozyten und Thrombozyten deutlich bessere Werte erreichte als die hier dargestellten. Die auf Erythrozyten liegenden Antigene z.B. des Rhesussystems können zu einer Immunisierung führen; daher kann die hier gefundene Kontamination nicht gebilligt werden. Diese Qualitätseinbuße konnte durch entsprechend vorsichtigere Handhabung weitgehend behoben werden. Weiter besteht die Möglichkeit, einen weiteren Zentrifugationsschritt durchzuführen, was, laut [SÖHNGEN, 1987], zur Gewinnung von beinahe zellfreiem Plasma notwendig ist.

Nach einer Studie von Söhngen et al. [SÖHNGEN, 1987] kommt es abhängig von der Zellzahl zu einer Gerinnungsaktivierung und zum Abfall von Faktor V/VIII. Außerdem haben auch

Spendedauer [HUH, 1989] und Qualität der Spende (Venenstauung, Punktion, Blut-Stabilisatormischung) und sogar psychische Faktoren [SANDER, 1989] einen Einfluß auf das Gerinnungssystem und damit auf die Qualität des Plasmas.

Wie üblich wird auch in der Abteilung für klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universität des Saarlandes die Qualität anhand der Plasmaspiegel von Faktor V und VIII kontrolliert. Dies sind laut [INTERNATIONAL FORUM, 1978] die empfindlichsten Parameter des Gerinnungssystems. Laut EG- und Bundesvorschrift sollen mindestens 70% des Ausgangswertes nach dem Auftauen noch in der Konserve sein. Auf den Gehalt an Gerinnungsfaktoren hat die Geschwindigkeit des Einfrierens einen Einfluß. So wurde herausgefunden, daß bei Schnelleinfrieren, d.h. innerhalb von weniger als 40 min. in einem Spezialbehälter, der Gehalt an Faktor VIII um 10% und der Gehalt an Faktor V gar nicht erniedrigt wurde. Langsames Einfrieren (bei <-30ºC im Gefrierschrank) hingegen erniedrigte den Faktor VIII-Spiegel um 20% und den Faktor V-Spiegel um immerhin 8% [ÅKERBLOM, 1992]. Bei [SÖHNGEN, 1987] sind die Auswirkungen sogar noch gravierender. Die in der Abteilung für klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universität des Saarlandes praktizierte Technik entspricht etwa der oben genannten langsamen Einfriermethode: Die einzelnen Plasmen werden gestapelt in einem Gefrierschrank bei -70°C eingefroren. Bis auch der Kern gefroren ist, vergehen einige Stunden. Hätte diese Zeit verkürzt werden können, wäre der Restgehalt an Gerinnungsfaktoren evtl. noch höher.

Ein Tieffriergerät, das Plasmen innerhalb von 60 Minuten schockgefriert, ist mittlerweile im Einsatz.

Dem Gesamteiweiß-Gehalt wird bei keiner Studie eine besondere Untersuchung gewidmet, sie ist abhängig vom Eiweißspiegels des einzelnen Spenders. Ein Wert von 60 g/l wird laut den hier durchgeführten Messungen immer eingehalten.

Die Qualität der hier untersuchten FFP, gemessen am Restgehalt an Gerinnungsfaktoren, ist sehr zufriedenstellend und bei Verwendung einer schnelleren Tieffriermethode sicher noch besser.

Leider ist die Gesamtqualität durch die hohe Zellkontamination stark eingeschränkt.

V.8 Rheologische Untersuchungen

Für die physiologische Funktion des Blutes ist seine Fließfähigkeit von besonderer Bedeutung [KIESEWETTER, 1987]. Die wichtigsten rheologischen Parameter sind Hämatokrit, Plasmaviskosität, Blutviskosität und Erythrozytenrigidität [JUNG, 1986], die neben einigen anderen über einen Zeitraum von vier Wochen überprüft wurden. Dabei zeigte sich eine deutliche Zunahme der Viskosität der Erythrozytenkonzentrate, was wiederum auf die Einschränkung der Rigidität der Erythrozyten zurückzuführen ist. Auch eine leichte Schwellung der Zellen (MCV von 85,3 auf 89,8) und die damit verbundene Zunahme des Hämatokrits spielt für die Verschlechterung der Fließfähigkeit eine Rolle. Die Viskosität des Plasmas verändert sich dagegen im Meßzeitraum nicht.

Vergleichende Untersuchungen zum rheologischen Verhalten von Erythrozytenkonzentraten in verschiedenen additiven Lösungen [KOERNER, 1988] zeigten, daß die Viskosität von EK in PAGGS-M zwischen den mit SAG-M und CPDA-1 erreichten Viskositäten liegt. Auch bei BARRAS [1989] nahm die EK-Viskosität im Laufe der Lagerungszeit von sieben Wochen kontinuierlich zu. Dabei blieben die Unterschiede zwischen den einzelnen Zusätzen bei verschiedenen Ausgangswerten vom ersten Tag an relativ konstant. Die beste Fließfähigkeit zeigte sowohl bei BARRAS [1989] als auch bei KOERNER [1988] SAG-Mannitol. Bisher wurden an in ADSOL gelagerten EK keine rheologischen Messungen durchgeführt, so daß man über die Funktion der Zellen über einen längeren Zeitraum keine Aussage machen kann.

Generell ist die Abnahme der Fließfähigkeit mit dem Entstehen von Mikroaggregaten und einer Schwellung der Erythrozyten zu erklären. Dies spielt vor allem in den Kapillaren eine große Rolle. Deshalb ist eventuell eine Filterung vor der Transfusion in Erwägung zu ziehen.

Ein interessantes Ergebnis zeigte sich im Laufe der Untersuchung: die Einzelwerte des mit dem elektronischen Zellzähler und mit der Zentrifuge gemessenen Hämatokrits wichen zum Teil erheblich voneinander ab. Dabei war immer der mit der Zentrifuge ermittelte Wert höher. Im Laufe von vier Wochen näherten sich die Werte aneinander an. Der Grund hierfür ist, wie auch schon weiter oben erwähnt, in der Funktionsweise des Zellzählers zu suchen. Dieser berechnet u.a. den Hämatokrit anhand gemessener und gezählter Parameter. Die Erythrozyten sind zu Beginn der Lagerungsdauer eher klein (im Ausstrich Stechapfelform) und nehmen erst nach einiger Zeit wieder an Volumen zu. So sind die Hämatokritwerte, die im Laufe der Studie ausschließlich

elektronisch bestimmt wurden, in Wirklichkeit etwas höher als hier ermittelt. Dann würden sich auch die Hämatokritwerte der in PAGGS-M gelagerten Erythrozytenkonzentrate im Normbereich befinden.

Zusammenfassend muß die Qualität der in der Abteilung für klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universität des Saarlandes produzierten Blutkomponenten als nicht zufriedenstellend bewertet werden. Ein oft deutliches Abweichen von den Richtlinien kann nicht akzeptiert werden. Solche Faktoren müssen unbedingt verbessert werden, so z.B. die hohe Kontamination durch Leukozyten und Erythrozyten bei den Plasmen. Dabei ist vor allem auf eine sachgemäße vorsichtige Handhabung der Blutkonserve zu achten. Auch die erhöhte Hämolyserate bei Lagerung von EK in PAGGS-M und ADSOL nach 7 Wochen ließe sich durch sachgemäße Handhabung sicher vermeiden.

Die hier angesprochenen Abweichungen führen zu einer deutlichen Qualitätseinbuße; dringend muß in der weiteren Verarbeitung von Blutprodukten auf die Einhaltung der gesetzlichen Richtlinien geachtet werden. Die Herstellungsmethoden wurden inzwischen verbessert, z.B. wurde ein Tieffriergerät, das Plasmen in 60 Minuten einfriert, angeschafft. Auch werden die obligatorisch vom medizinisch-technischen Personal durchgeführten Qualitätskontrollen zentral erfaßt und ausgewertet.

Literaturverzeichnis

Ackerblom,O., Bremme,K.,Dackland,A.L.,Fatah,K.,Suontaka,A.-M.,Blombeck,M.: Freezing Technique and Quality of Fresh-Frozen Plasma. Hrsg.: Infusionstherapie: 19. Band 1992. 283-287,

Ackerblom.O, Komponententherapie mit Additiva S.Beitr.Infusionsther., 26. 199046-49

Barras,J.P.,Jung,T.,Haberthür,C.,Koerner,K.Vergleichende Untersuchungen der rheologischen Eigenschaften von Erythrozytenkonzentraten während einer Lagerungszeit von sechs Wochen VASA18; 1989;122-127

Beaujean,F.,Segier,J.M.,Le Forestier,C.,Duedari,N.Leukozyte Depletion of Red Cell Concentrates by Filtration:Influende of Blood Product TemperatureVox Sang 62 1992; 242-243

Bensinger,T.A.,Zuck,T.F.Additional Studies Concerning the Metabolism of Transfusion16;1976; 353-356

Bergmann,H.Blutbestandteile-Therapie;Differentialindikation zur Erythrozytengabe: Infusionstherapie 4; 1980; 184-189

Bergmann,H.,Blauhut,B.,Gassner,W.,Haider,MNeue Wege der Blutkonservierung von Blutkomponenten mittels MehrfachbeutelWiener Medizinische Wochenschrift 21;1991; 485-492

Beutler,E.,West,C.Storage of Red Blood Cells in CPD-A2 for 42 and 49 days J. Lab.Clin.Med. 102; 1983; 53-62

Brockhaus EnzyklopädieF.A.Brockhaus Mannheim19; 1994; 662-663

BundesanzeigerArzneimittelgesetz 6; 1996

Button,L.N.,Orlina,R.A.,Kevy,S.V.,Josephson,A.M.The Quality of Over- and Undercollected Blood for TransfusionTransfusion16; 1976; 148-154

Butz,H.Leukozytendepletion :klinische Notwendigkeit und technische Möglichkeiten Transfusionsmedizinische Therapikonzepte zur Blutkomponentensubstitution; 1994

Ciba-Geigy AGWissenschaftliche Tabellen; Blut; 1977

Council of EuropeGuide to the preparation, use and quality assurance of blood componentsCouncil of Europe Press; 1996

Dawson,R.B.,Ellis,T.J.,Hershey,R.T.Blood preservation XVI Packed Red Cell Storage in CPD-AdenineTranfusion 16; 1976; 151-156

Dietrich,G.,Dietrich,K.,Kretschmer,V.,Eckle,E.Filtration of Buffy-Coat Free Red Cell Concentrates in Additive Solution Infusionstherapie 19; 1991; 51-156

Dzik,W.H.,Szuflad,P.Method for counting white cells (WBC) in WBC-reduced red cell concentratesTranfusion 33; 1993; 272-273

FeidenBetriebsverordnung für Pharmazeutische Unternehmer 1991

Fuller,B.J.,Grout,B.W.W.Clinical Application of Cryobiology; CRC Press 1991

Grundmann,R.Bluttranfusion vor 100 JahrenZentralbl Chir 118; 1993; 567-568

Heaton,A.,Miripos,J.,Aster,R.,Hartman,P.,Dehart,D.,Rzad,L.,Grapka,B.,Davisson,W.,Buchholz,D.H.Use of Adsol preservation solution for prolonged storage of low viscosity AS-1 red blood cellsBritish Journal of Haematology 57; 1984; 467-478

MHögman,C.L.,Ackerblom,o.,Hedlund,K.,Rosen,I.,Wiklund,L.Red cell suspension in SAGM MediumVox Sang 45; 1983; 217-223

Huh,Y.O.,Lichtinger, B.,Giacco,G.,Guinee,V.F.,Drewinko B.Effect of Donation Time on Platelet Concentrates and Fresh-Frozen PlasmaVox Sang 56; 1989; 21-24

Hutchin,P.: History of blood transfusion:A tercentennial lookSurgery 64; 1968; 685-700

Jung,F., Kiesewtter,H., Roggekamp,H.-G., Nüttens, H.P., Ringelstein, E.B., Gerhards,M., Kottischke,G., Wenzel,E., Zeller,H.: Bestimmung der Referenzbereiche rheologischer Parameter: Studie an 653 Zufällig ausgewählten Probanden; Klin.Wochenschrift 64; 1986 375-381

Kellner,S.: Qualitätsmerkmale von tiefgefrorenem Frischplasma; Beitr. Infusionsther. klin.Ernähr.

18; 1987; 178-180

Kiesewetter,H.,Jung,F.,Spitzer,S.,Müller,G.,Wenzel,E.Das klinisch rheologische LaborBiomed.Technik351990219-223

Kiesewetter,H.,Jung,F.,Wenzel,E.Klinische Bedeutung hämorheologischer Parameter; Münch. Med. Wochenschrift 43; 1987; 765-767

Körber,Ch., Sputtek,A., Rau,G.: Methoden und Anwendungsmöglichkeiten der Kryokonservierung von Erythrozyten mit Hydroxyethylstärke im Ein-Schritt-Verfahren Beitr. Infusionstherapie 18; 1992; 174-177

Körner,K.,Barras,J-P.,Jung,T.Rheologie gelagerter Erythrozytenkonzentrate in Plasmaersatzlösung Beitr. Infusionstherapie 21; 1988; 43-48

Körner,K.,Sahlmen,P.,Zimmermann,B.,Kubanek,B.Preparation of Leukocyte-Poor Red Cell Concentrates:Comparison of five different Filters Vox Sang 60; 1991; 61-62

Kretschmer,V.,KhanBlouki,K.,Biermann,E.,Söhngen,D.,Eckle,R.Improvement of Blood Component Quality – Automatic Separation of Blood Components in a New Bag SystemInfusionstherapie; 15; 1988; 232-239

Lane,A.,Anderson,K.C.,Goodnough,I.C.,Kurtz,S.,Moroff,G.,Pisciotto,P.C.,Sayers,M.,Silberstein,L.E.Leukocte Reduction in Blood Component TherapyAnnals of Internal Medicine 117; 1992; 151-162

Masse,M.,Andreu,A.,Babault,B.,Beaujean,F.,Bidet,M.L.,Boudart,D.,Calot,J.P.,Cotte,C.,Follea,G., Gerota,J.,Hau,F.,Hurel,C.,Legrand,E.,Marchessseau,B.,Nasr,O.,Robert,F.,Royer,D.,Schoon eman,F.,Tarvidel,R.,Vidal,M.A multicenter Study on the efficiency of white cell reduction by filtration of red cells: Transfusion 31; 1991; 792-797

Misterek,J.,Müller,K.,Bux,J.,Mueller-Eckmann,C.Präparation von leukozytenarmen Thrombozytenkontraten aus Buffy-Coat bei Einsatz eines neuen eines VierfachsystemsBeitr.infusionsther. 26; 1990; 96-98

Moog,R.,Holtmann,M.,Luboldt,W.Vergleich dreier ZellseparatorenBeitr.Infusionsther. 26; 1990; 123-126

Müller,N.Zur Entwicklung der TransfusionstherapieMünch.med.Wschr. 121; 1979; 1485-1488

Myhre,B.A.The first recorded blood transfusions:1656 to 1668: Transfusion 30; 1989; 358-362

Nei,T.Mechanism of Freezing njury to Erythrocytes :Effect of Initial Cell Concentrates on the Post-Thaw hemolysis: Cryobiology 18; 1981; 229-237

Noel,L.,Messian,O.,Fabre,G.,Saint-Blanc,J.,Saint-Paul,B.Red Cell in vivo Survival Studies of Additive SolutionBeitr.infusionsther. 21; 1988; 33-39

Oeser,W.,Sander,A.Pharma-Betriebs-Verordnung.Grundregeln für die Herstellung von Arzneimitteln(GMP)Kommentar Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft 1991

Pegg,D.E.The Effect of Cell Concentration on the Recovery of human Erythrozyte after Freezing and Thawing in the presence of Glycerol: Cryobiology 18; 1981; 221-228

Pieterz,R.N.I.,De Korte,D.,Reesink,H.W.,Dekker,W.J.A.,Van den Ende,A.,Loos,J.A.Storage of wholle blood for up to 24 hours at Ambient Temperature prior to Component PreparationVox Sang 56; 1989; 145-150

Pieterz,R.N.I.,.,Reesink,H.W.,Dekker,W.J.A.Comparison of a Conventional Quadruple-Bag with a `Top-and-Bottom´System for Blood ProcessingVox Sang 59; 1990 ;205-208

Pieterz,R.N.I., Reesink,H.W.,Dekker,W.J.A.Untersuchung eines neuen Mehrfach-Blutbeutelsystems mit oberem und unterem AbgangBeitr.infusionsther. 26; 1990; 60-64

Pieterz,R.N.I.,Steneker,I.,Reesink,H.W.,Dekker,W.J.A.Al,E.J.M.,Huisman,J.G.Comparison of Five different filters for the Removal of Leukocytes from Red Cell ConcentratesVox Sang 62; 1992; 76-81

Pieterz,R.N.I.,Steneker,I., Reesink,H.W.Blutkomponetenherstellung in Mehrfachbeutelsystemen und die Bedeutung von unterschiedlichen Blutkomponenten Transfusionsmed. Therapiekonzepte zur Blutkomponentensubstitution: Springer-Verlag 1994

PschyrembelKlinisches Wörterbuch: De Gruyter-Verlag 156; 1989

Sander,W.Die Qualität der Blutspende und ihr Einfluß auf die nachfolgende Präparation gerinnungsaktiver Plasmafraktionen: Z. ärtzl.Fortbildung 83;1989; 1247-1250

Sputtek,A.,Rau,G.Welche autologen Transfusionsverfahren stehen derzeit zur Verfügung, wie hoch sind ihre Kosten(Investitionen/Verbrauchskosten), und welche Risiken besten bei ihrer Anwendung?: Chir.Gastroenterol. 2;1 992; 143.145

Sputtek,A.,Körber,C.,Rau,G.Tieftemperaturkonservierung menschlicher Blutkörperchen mit dem Kryoprotektiv Hydroxyethylstärke-Bedeutung von HES-ModifikationZ Klin.Med. 46; 1991; 1567-1570

Sputtek,A.,Langer,R.,Schmid,H.,Steigerwald,R.,Trenkel,K.,Kron,W.,Henrich,H.A.,Körber,Ch.,Rau ,G.Kryokonservierung von Erythrozyten mit Hydroxyethystärke (HES) Transfusionsmedizin 30; 1992; 292-296

Sputtek,A.,Singbartl,G.,Schleinzer,W.,Rau,G.Erste Ergebnisse zum Ein-Schritt-Verfahren nach autologer Retransfusion von mit Hydroxyethylstärke(HES) kryokonservierten menschlichen roten BlutkörperchenResearch-Report Helmholtz-Institut Aachen1991/92; 144-155

Sputtek,A.,Singbartl,G.,Schleinzer,W.,Rau,G.Autologe Transfusion von mit Hydroxyethylstärke (HES) kryokonservierten Erythrozyten im SelbstversuchHämatologie 2; 1993; 150-157

Söhngen,D.,Eschholz,W.,Franke,K.,Kretschmer,V.,Prohaska,W.,Pelzer,H.,Walker,W.H.Präparativ e Einflüsse auf die Gerinnungsaktivität von Fresh Frozen Plasma (FFP): Beitr. Infusionsther. klin. Ernähr. 18; 1987; 181-187

Söhngen,D.,Schröter,A.,Saure,A.,Kretschmer,V.,Falke,H.,Prinz,H.Thrombozytenlagerung als plättchenreiche Plasmen (PRP) oder Konzentrate (TK)?: Beitr. Infusionsther. 21; 1988; 91-99

Steneker,I.,Prins,H.K.,Floorie,M.,Loos,J.A.,Biewenga,J.Mechanims of white cell Reduction in red cell concentrates by filtration: the effect of the cellular composition of the red cell concentrates: Transfusion 33; 1993; 42-49

Strauss,D.,Walper,A.,Berdsen,G.,Dekowski,D.,Mädler,J.,Seidel,B.,Maretzki,D.SAG-sucrose medium for red blood cell preservation: Biomed. Biochem 46;1987; 295-299

Suontaka,A.M.,Bremme,K.,Akerblom,O.,Blombäck,M.Blood Component Processing Technique and Plasma Quality Infusionstherapie 19; 1992; 110-114

Thomas,L.Labor und DiagnoseDie Medizinische Verlagsgesellschaft 4; 1995

Umlas,J.,Jacobson,M.,Kevy,S.V.Suitableurvival and half-Life of red cells after frozen storage in excess of 10 yearsTranfusion 31; 1991; 648-649

Vakkila,J.,Myllylä,G.Amount and Type of Leukocytes in “Leukocyte-Free”Red Cell and platelet ConcentratesVox Sang 53; 1987; 76-82

Walker,W.H.,Handel,K.D.,Netz,M.,Gänshirt,K.H.49-Tage-Lagerung von Erythrozyten-konzentraten in PAGGS-Sorbit: Beitr. Infusionsther. 26; 1990; 55-59

Wester,M.R.,Prins,H.K.,Huiman,J.G.A new radioimmunoassay for the detection of small amounts of white cells and platelets in red cell Concentrates Tranfusion 30; 1989; 117-125

Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer und vom BundesgesundheitsamtRichtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion: Deutscher Ärzte-Verlag 1991

Zeile,G.,Baake,M.,Henrici,G.Kompendium der praktischen HämatologieGIT Verlag Ernst Giebeler

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. E. Wenzel danke ich für das Überlassen der für die Messungen erforderlichen Räumlichkeiten und Geräte der Abteilung für klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg/Saar.

Herrn Prof. Dr. med. Dr.-Ing. H. Kiesewetter möchte ich für die Überlassung des Themas und Förderung bei der Durchführung der Arbeit danken.

Herrn Prof.. Dr.-Ing F. Jung und Herrn Dipl.-Ing. C. Mrowietz danke ich besonders für ihre Hilfe bei der Ausarbeitung der Arbeit.

Besonderer Dank geht auch an Herrn OA Dr.med.H.Radtke für seine Hilfe bei der Kryokonservierung von Erythrozytenkonzentraten und für seine Geduld bei der Korrektur dieser Arbeit.

Frau Monika Oos und Herrn Thomas Duppé danke ich stellvertretend für die Mitarbeiter der Hämostaseologie, ohne deren Hilfe und Geduld diese Arbeit nie zustande gekommen wäre.

Anhang

Parameter		Tag 1	Tag 8	Tag 15	Tag 22	Tag 29
SER[]	MW±SD Md p(10%-90%)	1,03±0,11 1,01 (0,88-1,14)	1,03±0,13 1,23 (1,01-1,3)5	1,36±0,09 1,39 (1,23-1,45)	1,49±0,16 1,45 (1,31-1,79)	1,61±0,14 1,58 (1,46-1,81)
BV[mPa.s]	MW±SD Md p(10%-90%)	5,18±0,64 5,11 (4,15-5,92)	5,58±0,95 5,47 (4,49-7,09)	6,08±1,03 6 (4,86-7,36)	6,44±1,11 6,39 (5,35-8,28)	7,25±1,53 7,25 (5,31-9,33)
PV[mPa.s]	MW±SD Md p(10%-90%)	1,16±0,006 1,19 (1,08-1,22)	1,14±0,07 1,15 (1,03-1,24)	1,15±0,07 1,16 (1,07-1,22)	1,13±0,08 1,14 (1,02-1,22)	1,12±0,08 1,11 (1,03-1,24
Hkt-S[%]	MW±SD Md p(10%-90%)	58,0±3,49 57,3 (53,8-62,4)	58,2±4,82 58,2 (51,9-64,3)	59,9±4,73 59,9 (54,7-66,5)	61,0±4,89 59,6 (55,5-68,2)	61,3±4,83 61,3 (55,7-68,5)
Hkt-Z[%]	MW±SD Md p(10%-90%)	63,2±4,60 64 (55,6-67)	62,4±5,22 61,5 (56,3-70)	63,5±4,72 64 (57,6-69,8)	64,0±4,24 63 (59,6-69,6)	63,6±4,25 62 (59,2-69,4)
LZ[10^3/ l]	MW±SD Md p(10%-90%)	1,46±1,01 1,1 (0,36-2,94)	1,37±0,92 1,1 (0,36-2,7)	1,16±0,77 1 (0,3-2,32)	0,97±0,67 0,8 (0,3-1,94)	0,97±0,72 0,8 (0,2-2,06)
EZ[10^6/ l]	MW±SD Md p(10%-90%)	6,81±0,54 6,65 (6,3-7,53)	6,81±0,60 6,91 (6-7,61)	6,90±0,61 6,94 (6,18-7,75)	6,88±0,58 6,77 (6,35-7,76)	6,83±0,56 6,84 (6,41-7,62)
TZ[10^3/ l]	MW±SD Md p(10%-90%)	3,29±1,90 3 (1,6-6)	6,24±2,62 6 (4-9,2)	6,76±4,57 6 (1,6-13,4)	11,5±6,98 9 (6,2-20)	10,1±8,46 6 (3-22,6)
MCV[fl]	MW±SD Md p(10%-90%)	85,3±4,33 85,8 (78,8-89,6)	85,5±3,85 86,3 (80,3-89,1)	87,3±3,51 87,7 (82,4-91,1)	88,7±3,92 89,2 (83,6-93,9)	89,8±4,11 90 (85-96,4)

Eidestattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und dass die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Susanne Schüler