

Aus der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie
In der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik Würzburg
(Leiter: Prof. Dr. med. M. Böck)

Gewaschene Erythrozytenkonzentrate, hergestellt mit Hilfe eines
neuen Verfahrens, und ihre Qualitätsbeurteilung anhand mehrerer
biochemischer Parameter

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Gabriela Maria Waltenberger
aus Schlierstadt

Würzburg, Mai 2002

Referent: Univ.–Prof. Dr. med. Dieter Wiebecke

Korreferentin: Univ.–Prof. Dr. med. Heide Rückle-Lanz

Dekan: Univ.–Prof. Dr. med. Volker ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2003

Die Promovendin ist Ärztin

Meiner Mutter in großer Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Herstellung und Lagerung von gewaschenen Erythrozytenkonzentraten	1
1.2	Indikationen für gewaschene Erythrozytenkonzentrate	2
1.3	Arbeitsziel	2
2	MATERIAL UND METHODEN	3
2.1	Durchführung der Blutentnahmen	4
2.2	Herstellung der Erythrozytenkonzentrate	5
2.3	Prüfung auf Sterilität (nach DAB 10)	7
2.4	Bestimmung der biochemischen Parameter	8
2.4.1	pH-Wert	8
2.4.2	Bestimmung des Hämatokrits	9
2.4.3	Adenosintriphosphat (ATP)	9
2.4.3.1	Theoretische Grundlagen	10
2.4.3.2	Meßprinzip und –methode	11
2.4.3.3	Testdurchführung	11
2.4.4	2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG)	13
2.4.4.1	Theoretische Grundlagen	13
2.4.4.2	Meßprinzip und –methode	14
2.4.4.3	Testdurchführung	16
2.4.4.4	Berechnung	17
2.4.5	Elektrolyte	18
2.5	Osmotische Resistenz	18
2.5.1	Theoretische Grundlagen	18
2.5.2	Meßprinzip	19
2.5.3	Testdurchführung	20
2.5.4	Auswertung	20
2.6	Statistische Auswertung	21

3	ERGEBNISSE	22
3.1	Adenosintriphosphat	22
3.2	Hämolyserate	23
3.3	2,3-Dihposphoglycerat	25
3.4	pH-Wert extrazellulär	26
3.5	Natrium intrazellulär	27
3.6	Natrium extrazellulär	28
3.7	Kalium intrazellulär	30
3.8	Kalium extrazellulär	31
3.9	Kohlendioxidpartialdruck	33
3.10	Sauerstoffpartialdruck	35
3.11	Sterilitätsprüfung	36
4	DISKUSSION	37
4.1	Physiologische Erythrozytenalterung	37
4.2.	Erythrozytenkonzentrate und ihre Veränderungen während Lagerung in einer Additivlösung	37
4.3	Beurteilung der Qualität von Erythrozytenkonzentraten	39
4.4	Biochemische und osmotische Veränderungen bei gelagerten EK	39
4.4.1	Adenosintriphosphat (ATP)	39
4.4.2	Hämolyse	41
4.4.3	2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG)	44
4.4.4	pH-Wert extrazellulär	47
4.4.5	Kalium intra- und extrazellulär	50
4.4.6	Natrium intra- und extrazellulär	50
4.4.7	Sauerstoffpartialdruck pO_2	50
4.4.8	Kohlendioxidpartialdruck pCO_2	51
4.4.9	Beutelmaterial und –beschaffenheit	53

5	ZUSAMMENFASSUNG	55
6	LITERATURVERZEICHNIS	56
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	77
8	MEßWERTTABELLE	78
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	79

Danksagung

Lebenslauf

1 EINLEITUNG

1.1 Herstellung und Lagerung von gewaschenen Erythrozytenkonzentraten

Ein gewaschenes Erythrozytenkonzentrat erhält man durch mehrmaliges Aufschwemmen, Zentrifugieren und Dekantieren eines leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentrates mittels einer geeigneten Waschlösung. Hierdurch wird das Restplasma aus dem EK weitgehend entfernt, ebenso seine stabilisierenden Zusätze und Antikoagulantien. Als Waschlösungen wurden in der Vergangenheit überwiegend gepufferte oder ungepufferte, sterile physiologische Kochsalzlösungen verwendet. Da nach diesem Verfahren hergestellte Erythrozytenkonzentrate keinerlei Nährsubstrate mehr enthalten, können sie maximal 24 Stunden bei 4°C aufbewahrt werden. Die strikte Anforderung, sie spätestens nach Ablauf dieser Frist zu verwerfen, ergab sich bisher auch noch aus einem weiteren Grund, nämlich aus der nie ganz auszuschließenden Möglichkeit einer bakteriellen Kontamination des Präparates im Zuge der Eröffnung des geschlossenen Systems, die zum Einbringen der Waschlösung unvermeidlich war. Dieser Gefahr kann inzwischen durch Anwendung des "Sterile-Docking-Verfahrens" (s.u.) begegnet werden. Der Autorin stellt sich nun die Frage, ob es mittlerweile möglich ist, die Haltbarkeit eines gewaschenen EK unter Verwendung einer geeigneten Waschlösung erheblich zu verlängern. Als solche bot sich in erster Linie eine im Handel befindliche und arzneimittelrechtlich zugelassene "Additive Lösung" (s.u.) an, wie sie zur Aufbewahrung normaler Erythrozytenkonzentrate seit langem verwendet wird.

1.2 Indikationen für gewaschene Erythrozytenkonzentrate

Kongenitaler IgA-Mangel, das Vorhandensein von Anti-IgA-Antikörpern, Antikörper gegen andere Plasmaproteine, Patienten mit infektassoziierter, neuraminidase-induzierter hämolytischer Anämie (= Demaskierung des T-Kryptantigens) (Neppert 1993) sowie Patienten mit komplementabhängiger, autoimmunhämolytischer Anämie (AIHA) sind die Hauptindikationen für die Verabreichung von gewaschenen Erythrozytenkonzentraten (Walker 1996). Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH), ein erworbener klonaler Stammzellschaden mit abnormer Sensitivität der Erythrozyten gegenüber Komplementlyse, ist nach heutigem Kenntnisstand keine gesicherte Indikation für gewaschene EK (Brecher et al 1989). Der Anteil der Transfusionen mit gewaschenen EK ist somit sehr gering.

1.3 Arbeitsziel

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob sich ein Wechsel der Wasch- und Resuspensionslösung von physiologischer Kochsalzlösung zu einer Additivlösung bei der Herstellung gewaschener Erythrozytenkonzentrate positiv auf deren biochemische Lagerungsqualität auswirkt.

Aus der Tatsache heraus, dass mit NaCl gewaschene Erythrozytenkonzentrate –unabhängig von der Kontaminationsproblematik– praktisch nicht gelagert werden können, wurden die Erythrozytenkonzentrate in SAG-M gewaschen und gelagert und deren biochemische Lagerungsqualität mit derjenigen ungewaschener, nur in CPD gelagerten Kontrollerythrozyten verglichen. Die rheologische Qualität der so aufbereiteten Erythrozytenkonzentrate wurde parallel erfasst (Grossmann et al 1998).

2 MATERIAL UND METHODE

Am Entnahmetag wurden 16 frische Vollblutkonserven, mit einem Volumen von 450 ml, versehen mit 63 ml CPD (Optipac, Baxter, Unterschleißheim) unter Standardbedingungen in Erythrozytenkonzentrat (EK) und Plasma aufgetrennt. Der Buffy-coat wurde jeweils verworfen. Jede der 16 Erythrozytenkonzentrate wurde halbiert. Der eine Teil wurde mit Hilfe einer Konservenzentrifuge (Roto Silenta/RP, Hettich, Tuttlingen) bei 3080 U/min (entspricht 3012 g) sowie Einsatz des "sterile-docking" zweimal mit je 200 ml SAG-M gewaschen und darin auch resuspendiert. Die andere Hälfte wurde nicht behandelt in SAG-M gelagert und als Kontrolle für die nachfolgend beschriebenen Messungen mitgeführt. Der Hämatokrit (HK) der gewaschenen EK wurde dabei auf den HK der Kontrolle eingestellt. Die Messungen des Hämatokrits erfolgten dabei mit einer Hämatokritzentrifuge (Biofuge A, Heraeus Sepatech, Osterode). Am 1., 14., und 28. Tag wurden von den gewaschenen EK und den entsprechenden Kontrollen diverse Parameter bestimmt:

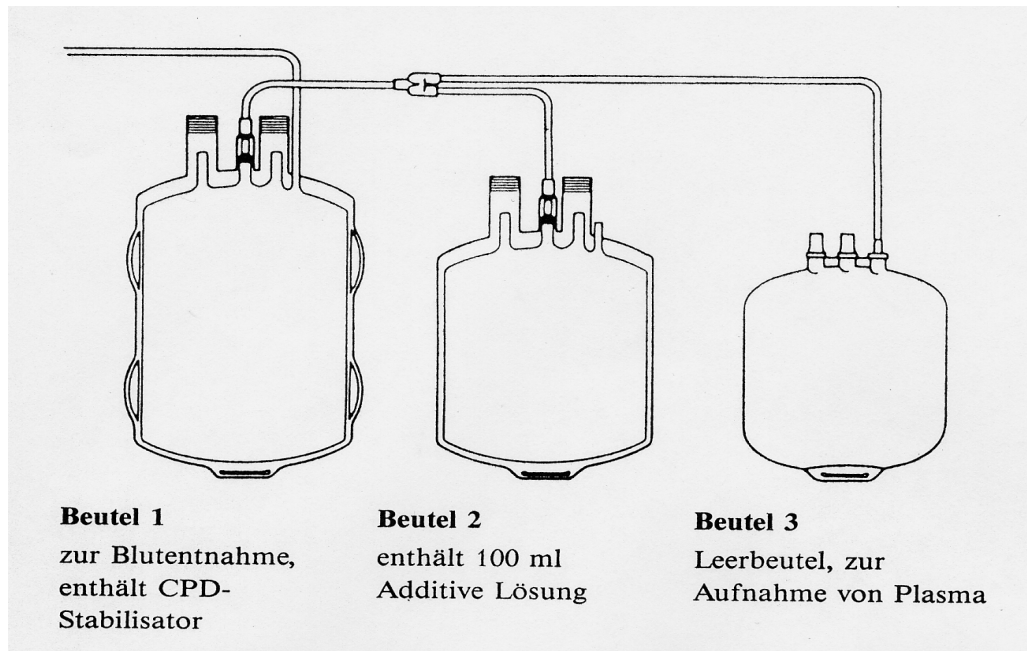
1. Photometrische ATP-Bestimmung (Test-Kit, Sigma Diagnostics, Deisenhofen, Kat.-Nr. 366 und Pharmacia Biosystems, Freiburg)
2. Photometrische 2,3-DPG-Bestimmung (Test-Combination Boehringer Mannheim, Best. Nr.148 334; Ultrospec III, Pharmacia Biosystems Freiburg)
3. pH-Wert-Messung (AVL 995-S Automatic Blood Gas System, Bad Homburg)
4. Sterilität (nach DAB 10)
5. Elektrolytmessung am Flammenphotometer (ATM 5050, Eppendorf, Hamburg)
6. Photometrische Bestimmung des freien Hämoglobins mit Ultrospec III Photometer (Fa. Pharmacia LKB Biochrom, Freiburg)

Die intra-und extrazellulären Elektrolytkonzentrationen beider Präparationen wurden zusätzlich noch am Tag 42 gemessen.

2.1 Durchführung der Blutentnahmen

Von insgesamt 16 Blutspendern wurde nach Aufklärung über den Verwendungszweck das Einverständnis eingeholt. Die Spender waren nach geltenden Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion spendefähig, das Blut durfte jedoch aus diversen Gründen nicht zur Transfusion freigegeben werden (z.B. Spender war zuvor in Malariagebiet).

Die Blutentnahmestelle des Patienten wurde desinfiziert und anschließend wurden 450 ml Vollblut in den Primärbeutel eines sterilen Dreifach-U-Beutelsystems aus PVC (Högman et al 1988) mit 2,3 Ethylhexylphthalat als Weichmacher (Biopack U-Beutelsysteme, Biotrans, Dreieich), überführt (Högman CF, 1992). Der Primärbeutel enthielt 63 ml CPD-Stabilisatorlösung (Zusammensetzung lt. Tabelle 1, S.11) zur Verhinderung der Gerinnung (Högmann et al, 1981) und war mit zwei Satellitenbeuteln verbunden. Der eine Beutel war für die Plasmafraktion, der andere Beutel war mit 100 ml Additivlösung SAG-M (Zusammensetzung lt. Tabelle 1, S.11) gefüllt und für das EK vorgesehen.

Abbildung 1: Dreifach-U-Beutelsystem

Während der Entnahme wurde der Blutbeutel mit Hilfe einer Mischwaage (MW 5001 electronic, Biotrans, Dreieich) permanent bewegt, um eine rasche und gleichmäßige Verteilung der Zitratlösung zu gewährleisten. Um die Leukozytendepletion durch Entfernung des Buffy-coat zu verbessern, wurden die Konserven nach Abschluß der Entnahme etwa 90 Minuten bei Raumtemperatur (22–24 °C) ruhig liegengelassen. Im Anschluß daran begann die Aufbereitung der Blutkonserven.

2.2 Herstellung der Erythrozytenkonzentrate

Nach der oben beschriebenen Ruhezeit des Blutes wurde jede Konserve bei 3012 g und 22 °C, 15 Minuten lang zentrifugiert (Roto Silenta/RP Hettich, Tuttlingen). Das Blut wurde danach mit Hilfe einer automatischen Blutbeutelpresse (Fenwal Optipress, Uppsala Process Data-AB Pradab, Uppsala) in EK und Plasma getrennt, letzteres in einen sogenannten

Sekundärbeutel überführt. Das Frischplasma wurde schockgefroren (Kryomat K60 SD, Dr. R. Wobster KG, Lauda) und bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Der im Beutel 1 zurückgebliebene Buffy-coat (sogenanntes "top and bottom-system") wurde verworfen.

Das EK wurde gewogen und eine Hälfte in einen 300 ml-Leerbeutel (Biopack Leerbeutel, Biotrans, Dreieich) überführt. Im Anschluß daran wurde diese unbehandelte Hälfte in drei 150 ml-Leerbeutel für die verschiedenen Meßzeitpunkte aufgeteilt. Die andere Hälfte wurde mit 200 ml SAG-M-Lösung aufgeschwemmt, zentrifugiert und der Überstand abgepreßt (Zentrifugation wie oben beschrieben). Dies wurde zweimal wiederholt und zuletzt das "trockene" EK-Sediment in SAG-M-Additivlösung resuspendiert. Der Hämatokrit des gewaschenen EK wurde auf den der Kontrolle eingestellt. Die Hämatokritbestimmung wurde mit der HK-Zentrifuge (Biofuge A, Heraeus Sepatech, Osterode) bei 12000 U/min, 10 min durchgeführt. Diese gewaschene Hälfte wurde ebenfalls in drei Fraktionen aufgeteilt, nachdem zuvor 50 ml für eine Sterilprobe entnommen wurden.

Alle EK wurden bis zur Verwendung bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) gelagert.

Tabelle 1 Verwendete Stabilisator- bzw. Additivlösung

Zusammensetzung der Lösungen (g/100ml)	CPD-Lösung (Stabilisator)	SAG-M-Lösung (Additivlösung)
Zitronensäure x H ₂ O	0.327	—
Natriumzitrat x H ₂ O	2.63	—
Natriumdihydrogenphosphat	0.251	—
Glucose-Monohydrat	2.32	0.81
Mannitol	—	0.525
Adenin	—	0.0169
Natriumchlorid	—	0.877
PH-Wert	5.6	4.8
Osmolarität mosm/kg	438	369

Um bei den Wasch- und Verteilungsprozessen die Sterilität zu wahren, wurden für sämtliche Schlauchverbindungen ein Sterilschlauch-Schweißgerät (SCD 312, Du Pont, Newtown) verwendet. (Man nennt dieses Verfahren "Sterile-Docking"-Verfahren). Hierbei schmilzt sich eine glühende Metallklinge durch die zu verbindenden Plastikschläuche und die heißen, weichen Schlauchenden werden mit Druck zusammengefügt.

2.3 Prüfung auf Sterilität (nach DAB 10)

Die zuvor abgefüllte Sterilprobe von 50 ml wurde vom Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg (nach DAB 10) auf zwei verschiedenen Nährmedien auf Keimfreiheit getestet.

Die Medien selbst wurden zuvor einer Prüfung auf Eignung und Sterilität unterzogen. Die einzelnen Arbeitsschritte der Probenuntersuchung auf Sterilität wurden an einem Arbeitsplatz mit "turbulenzarmer Verdrängungsströmung"

(Laminar-flow-Bank) durch regelmäßige Kontrollen auf Keimarmut durchgeführt. Für die Sterilitätsprüfung wurden zwei verschiedene Nährmedien verwendet: ein Thioglycolat-Medium für aerobe und anaerobe Bakterien sowie ein Sojapepton-Caseinpepton-Medium zum Nachweis von aeroben Bakterien und Pilzen. Jedes Nährmedium wurde mit 10–20 ml Blut des zu untersuchenden EK beschickt und dann eine Woche bei unterschiedlichen Temperaturen in Glasbehältern bebrütet. Zur Erfassung einer bakteriellen Verunreinigung waren Temperaturen zwischen 30 und 35 °C nötig, zum Nachweis von Pilzen nur 20 bis 25 °C. Nach dieser sogenannten Anreicherungsphase wurde das Material auf spezielle Kulturplatten geimpft und nochmals 48 Stunden bebrütet. Um Spuren von Antibiotika in der Blutprobe auszuschließen, wurden Prüfkeime wie *Staphylococcus aureus*, *Clostridium sporogenes* und *Candida albicans* auf Nährmedien mit und ohne Blutprobe inkubiert und verglichen. Die Nährmedien mussten gleiches Wachstumsverhalten zeigen. Erst dann durfte die Sterilitätsprüfung durchgeführt werden. War zu keiner Zeit der Kultureninkubation ein Zeichen des Wachstums zu sehen, durfte die Blutprobe als steril bezeichnet werden. Eine artifizielle Verunreinigung hätte durch zwei Wiederholungsprüfungen ausgeschlossen werden müssen (Deutsches Arzneibuch, 1994).

2.4 Messung der biochemischen Parameter

2.4.1 pH-Wert

Nach der Probenentnahme wurde der extrazelluläre pH-Wert mit Hilfe eines Blutgasanalysegeräts (AVL 995, AVL Medizintechnik, Bad Homburg) bei fest-eingestellter Temperatur von 37 °C und einem ebenfalls definierten Hämoglobingehalt von 15 g/%, bestimmt. Dabei wurden gleichzeitig pCO₂ und pO₂ gemessen.

2.4.2 Bestimmung des Hämatokrits

Die Bestimmung des Hämatokrits (HK) erfolgte in Doppelbestimmung nach der Kapillarmethode (Wintrobe, 1929). Dazu wurde aus den zu untersuchenden Proben eine definierte Menge Blut in je zwei heparinbeschichtete Mikrokapillaren bis zur Markierung aufgezogen, entsprechend verschlossen und in eine Hämatokritzentrifuge (BiofugeA, Heraeus Sepatech, Osterode) für zehn Minuten bei 15.000 U/min zentrifugiert. Das auf diese Weise entstandene, sedimentierte Zellvolumen gibt den prozentualen Anteil am Gesamtvolumen an (HK in %).

Aus dem gemessenen HK und der Gesamtmenge des im jeweiligen Blutbeutel enthaltenen Blutes wurde über eine Dreisatzrechnung der Hämatokritwert einer jeden Blutprobe auf einen Hämatokritwert von 40 % eingestellt, das heißt eine definierte Menge an physiologischer Kochsalzlösung hinzugefügt. Dadurch wurde eine diesbezügliche Vergleichbarkeit sämtlicher Präparate erreicht.

2.4.3 Adenosintriphosphat (ATP)

Die Bestimmung des ATP-Gehalts erfolgte nach dem von Jaworek et al (1973) beschriebenen enzymatischem Verfahren. Dazu wurde ein kommerzieller Testkit verwendet (Nr. 366, der Firma Sigma Diagnostics, St. Louis, USA).

2.4.3.1 Theoretische Grundlagen

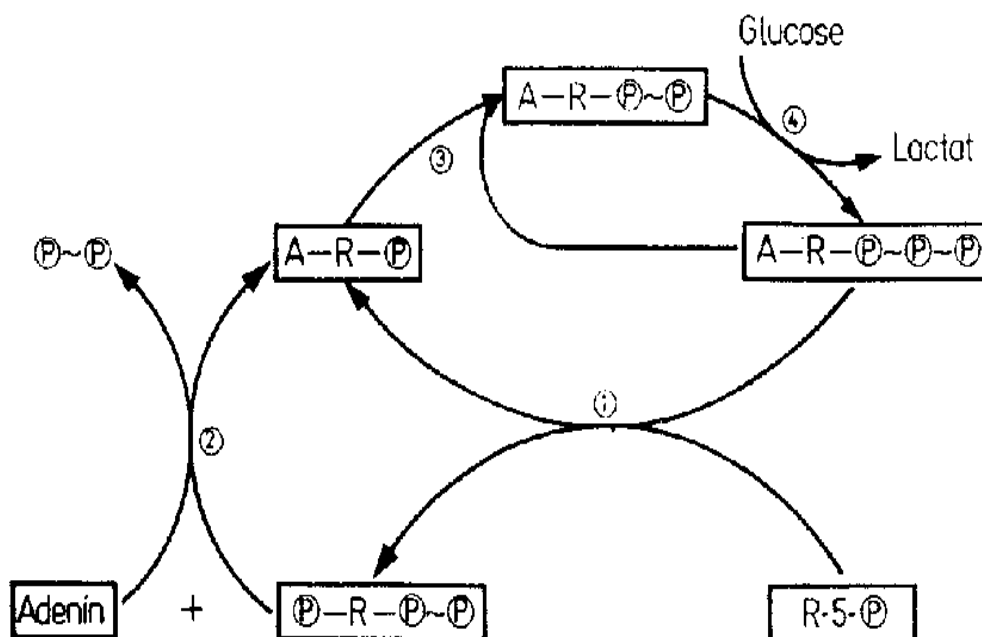
Zur Aufrechterhaltung des erythrozytären Stoffwechsels sowie seiner Struktur- und Ionenzusammensetzung ist Adenosintriphosphat, das bei der Glykolyse entsteht, von entscheidender Bedeutung. Eine Abnahme von ATP und anderer wichtiger Bestandteile führen zu Form- und Membranveränderungen der Erythrozyten und dadurch zur Hämolyse. Die Lebensdauer der Erythrozyten

beträgt in vivo etwa 120 Tage. Ähnliche Verhältnisse in vitro zu schaffen ist erstrebenswert, um das Blut für Transfusionszwecke möglichst lange lagern zu können.

Die ATP-Gewinnung geschieht im Erythrozyten in erster Linie folgendermaßen (s. Abbildung 2, S.10):

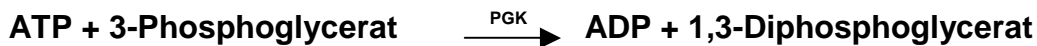
Ribose-5-phosphat wird mittels einer Kinase zu Phosphoribosylpyrophosphat umgewandelt (1). Dieses reagiert mit Adenin zu Adenosinmonophosphat (AMP) (2), das wiederum mittels einer Adenylat-kinase-Reaktion zu Adenosindiphosphat (ADP) (3) und über die Glykolyse zu ATP aufgebaut wird (4).

Abbildung 2 ATP-Synthese im Erythrozyten (Rapport 1977)



2.4.3.2 Meßprinzip und -methode

Erster Reaktionsschritt:



Beim ersten Reaktionsschritt wird Adenosintriphosphat bei Zugabe von ausreichend 3-Phosphoglycerat und dem Enzym Phosphoglycerat-Kinase (PGK) zu Adenosindiphosphat und 1,3-Diphosphoglycerat umgesetzt.

Die Menge an entstandenem 1,3-Diphosphoglycerat ist der im Test eingesetzten Menge an ATP äquimolar.

Zweiter Reaktionsschritt:



In einem zweiten Reaktionsschritt wird das zuvor entstandene 1,3-Diphosphoglycerat mit NADH und Zusatz von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat und anorganischem Phosphat umgesetzt. Dabei wird 1,3-Diphosphoglycerat und die dem ATP äquimolare Menge an NADH zu NAD⁺ oxidiert. NADH besitzt bei einer Wellenlänge von 340 nm ein charakteristisches Absorptionsmaximum, die Extinktionsabnahme ist somit ein Maß für die ATP-Konzentration der Probe (Jaworek et al 1974).

2.4.3.3 Testdurchführung

Zu Beginn wurden sowohl die beiden EK (gewaschene und unbehandelte Kontrolle) als auch das ATP-Standardserum aufgetaut und auf

Zimmertemperatur gebracht. Die beiden EK wurden mit dem portioniert gefroren gelagerten, autologen Plasma auf einen Hämatokrit von 40 % eingestellt. Damit sollten annähernd Posttransfusionsbedingungen geschaffen und eine Vergleichbarkeit der Meßergebnisse gewährleistet werden.

Die Probenvorbereitung begann damit, dass je 1 ml Blut und 1 ml 12 %-ige Trichloressigsäurelösung (TGA) in ein Zentrifugenglas pipettiert wurden (Eppendorf Varipette 4810, variable Kolbenhubpipette, in Zehntel-Mikroliterschritten einstellbar). Die Proben wurden gemischt und fünf Minuten im Eisbad inkubiert. Mit den drei Standards wurde ebenso verfahren und diese wurden auch weiterhin wie eine Probe behandelt. Nach der Inkubation wurden die Proben bei 3000 U/min fünf bis zehn Minuten zentrifugiert (Hettich-Zentrifuge, Rotixa). Dies ergab einen klaren und proteinfreien Überstand, der für den Test eingesetzt werden konnte. Für den Testansatz wurden eigens dafür vorgesehene Gefäße verwendet, die mit 0,3 mg NADH gefüllt waren. In diese Gefäße wurden je 1,0 ml PGA- (Phosphoglycerat) gepufferte Lösung und je 1,5 ml Wasser vorgelegt. Dann wurden je 0,5 ml Probenüberstand bzw. Standard hinzupipettiert. Nach dem Mischen wurde 1 ml davon in Halbmikroküvetten abpipettiert und von jedem Ansatz die Extinktion E1 gegen Wasser wie folgt gemessen. Mit dem Spektralphotometer (Ultrospect III, Pharmacia Biosystem, Freiburg) wurde, nach zehnminütiger Einbrennzeit der Lampe, bei einer Wellenlänge von 334 nm von jeder einzelnen Probe die Extinktion E1 gegen einen Leerwert von Wasser gemessen. Der Messwert wurde digital angezeigt und notiert. Daraufhin wurden in jede Küvette 13,4 µl GAPD/PGK Enzymmischung pipettiert und gemischt. Nach fünf Minuten Inkubation war das Extinktionsminimum erreicht. Diese Endextinktion (E2) wurde dann wieder von jeder Probe photometrisch gemessen. Bei jedem Probenansatz wurde als interne Qualitätskontrolle ein Standardserum mit einem definierten ATP-Gehalt mitgeführt.

Aus den beiden Extinktionswerten wurde dann der ATP-Gehalt in $\mu\text{mol/l}$ nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$\begin{aligned}\text{Blut-ATP} &= (E_1 - E_2) \times 196,76 \times 10 \text{ } [\mu\text{mol/l}] \\ \text{Hb-ATP} &= \frac{(E_1 - E_2) \times 196,76}{\text{Hb}} \text{ } [\mu\text{mol/gHb}]\end{aligned}$$

Der ATP-Gehalt wurde aus Standardisierungsgründen auf den Hb-Gehalt der Probe bezogen.

Normalwerte: Blut ATP: 38-62 $\mu\text{mol/dl}$
Hämoglobin ATP: 3,65-4,45 $\mu\text{mol/gHb}$

Alle ATP-Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt und für die Auswertung der Mittelwert herangezogen.

2.4.4 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG)

Für die Bestimmung der 2,3-DPG-Konzentration wurde ein Testkit der Firma Boehringer Mannheim verwendet. Der Testkit war nur für Forschungszwecke, nicht für Routineuntersuchungen, vorgesehen. Die Best.-Nr. des Kits war 148 334. Die Bestimmung erfolgte enzymatisch nach der Methode von Ericson et al (1972).

2.4.4.1 Theoretische Grundlagen

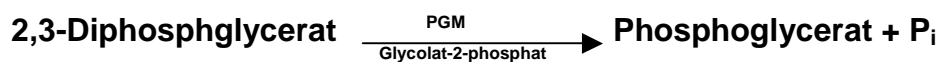
Der Energiestoffwechsel der Erythrozyten besteht im Abbau der Glucose. Dabei läuft 90 % über die anaerobe Glycolyse ab, die restlichen 10 % über den Pentosephosphatweg. Es entstehen die energiereichen Verbindungen

Adenosintriphosphat (ATP), 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG) und Nicotinamiddinucleotidphosphat. 2,3-Diphosphoglycerat ist von zentraler Bedeutung bei der Regulation der Sauerstoffbindung und -abgabefähigkeit des Hämoglobins in den Erythrozyten (Benesch et al 1967).

Steigt die 2,3-DPG-Konzentration im Blut an, kommt es zu einer Rechtsverschiebung der Sauerstoffdissoziationskurve des Hämoglobins, das heißt, einer erleichterten Abgabe von Sauerstoff an das Gewebe. In Versuchen von Valerie et al (1969) konnte gezeigt werden, dass 36–48 Stunden nach EK-Transfusionen die 2,3-DPG-Konzentration wieder Normwerte erreicht. Dieses ist für eine optimale Sauerstoffabgabe im Gewebe von entscheidender Bedeutung.

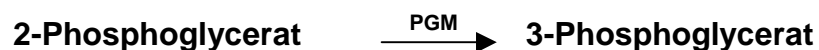
2.4.4.2 Meßprinzip- und methode

Erster Reaktionsschritt:



2,3-Diphosphoglycerat wird durch eine mit Glycolat-2-Phosphat aktivierte Nebenaktivität der Phosphoglycerat-Mutase (PGM) zu Phosphoglycerat (PG) und Phosphat gespalten. Bei dieser Reaktion entsteht sowohl 2-PG als auch 3-PG.

Zweiter Reaktionsschritt:



In einer weiteren Reaktion wird durch erneute Zugabe von Phosphoglycerat-Mutase (PGM) 2-PG zu 3-PG isomerisiert.

Dritter Reaktionsschritt:



In diesem Reaktionsschritt wird durch die Zugabe von ATP das zuvor gebildete 3-PG unter katalytischer Wirkung von Phosphoglyceratkinase (PGK) zu 1,3-DPG und ADP umgesetzt.

Vierter Reaktionsschritt:



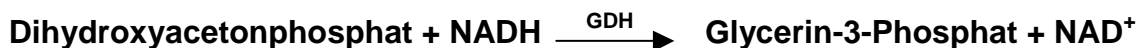
1,3-DPG wird zusammen mit NADH unter katalytischer Wirkung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat umgesetzt. Bei dieser Reaktion entstehen äquimolar NAD^+ und anorganisches Phosphat.

Fünfter Reaktionsschritt:



Glycerinaldehyd-3-phosphat wird durch Triosephosphatisomerase (TIM) zu Dihydroxyacetonphosphat umgesetzt.

Sechster Reaktionsschritt:



Dihydroxyacetonphosphat wird in einem letzten Schritt mit NADH unter katalytischer Wirkung des Enzyms Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GDH) zu Glycerin-3-Phosphat und NAD^+ umgesetzt.

Bei diesem Reaktionsablauf entstehen pro Mol 2,3-DPG je 2 Mol NAD^+ aus NADH durch Oxidation.

Bei der Messung der 2,3-DPG-Konzentration ist die Extinktionsabnahme nach 25 Minuten bei einer Wellenlänge von 365 nm dem NADH-Verbrauch proportional. Der NADH-Verbrauch wiederum entspricht dem 2,3-DPG-Gehalt der Probe (Ericson et al 1972).

2.4.4.3 Testdurchführung

Nach Einstellung des Hämatokrits der EK auf einen Wert von 40 % wurden jeweils 0,5 ml in ein 10 ml-Zentrifugenglas pipettiert und 2,5 ml einer eisgekühlten 0,6 molaren Perchlorsäure hinzugegeben. Unter kräftigem Schütteln wurde so das Eiweiß ausgefällt und danach die Mischung zehn Minuten lang bei 1000 U/min und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert (Rotixa/KS, Hettich; Tuttlingen), um den Eiweißanteil abzutrennen.

Der klare Überstand wurde abpipettiert und 2 ml davon in ein weiteres 10 ml-Zentrifugenglas, im Eisbad befindlich, pipettiert.

Durch Zugabe von 0,25 ml einer 2,5 molaren Kaliumbicarbonatlösung wurde die überschüssige Säure neutralisiert. Nach sorgfältigem Durchmischen wurde diese Lösung für 30 Minuten im Eisbad inkubiert. Dabei bildete sich ein Perchloratniederschlag. Um diesen Niederschlag zu entfernen wurde die Probe wiederum zehn Minuten lang bei 1000 U/min bei 4 °C zentrifugiert (Rotixa/KS, Hettich, Tuttlingen). Für den nachfolgenden Testansatz wurden 0,1 ml des klaren Überstandes eingesetzt.

Zur Bestimmung der 2,3-DPG-Konzentration im Blut wurden 2 ml Triäthanolamin-Puffer (enthält EDTA und $MgCl_2$), 50 µl ATP/NADH-Lösung und 50 µl Enzymlösung (PGM, PGK, GAPDH, TIM, GDH) in eine 2 ml-Meßküvette vorgelegt. Zu dieser vorgelegten Lösung wurden 0,1 ml des vorher enteiweißten und neutralisierten Überstandes (oben beschrieben) zupipettiert, das Ganze sorgfältig gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur (21 °C) inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Extinktion E_1 bei 365 nm gemessen.

Anschließend wurden 20 µl PGM-Lösung und 20 µl Glycolat-2-Phosphat-Lösung hinzugefügt, wodurch die zuvor beschriebene Nebenaktivität der Phosphoglyceratmutase aktiviert wird. Nach abgelaufener Reaktion (etwa 25 Minuten) wurde die Endextinktion E_2 gemessen.

2.4.4.4 Berechnung

Nach der Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration (C) gilt:

$$C = \frac{V \times MG \times F}{\epsilon \times d \times v \times 1000 \times 2} \times \Delta E \text{ [g/l Blut]}$$

V: Testvolumen in ml (2,24 ml)

v: Probevolumen in ml (0,1 ml)

MG: Molekulargewicht von 2,3 DPG

D: Schichtdicke in cm (1,0 cm)

ϵ : Extinktionkoeffizient von NADH bei 365 nm [$3,4 \cdot l \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

F: Verdünnungsfaktor für Blut, bei Flüssigkeitsgehalt 80 % ist $F = 6.582$

ΔE : Extinktionsdifferenz bei 365 nm ($E_1 - E_2$)

Normalwerte: 4,68-4,98 mmol 2,3-DPG/l Erythrozyten
(Ericson , de Verdier 1972)

2.4.5 Elektrolyte

Die Elektrolyte Natrium und Kalium, extrazellulär, sowie Eisen gesamt wurden im Naßchemieverfahren mit Reagenzien der Firma Boehringer Mannheim am Autoanalyzer Hitachi 747 bestimmt. Zur Bestimmung der extrazellulären Werte wurden die Proben direkt eingesetzt, zur Ermittlung der intrazellulären Natrium- und Kaliumkonzentrationen wurden 2,0 ml Erythrozytenkonzentrat abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Von dem Erythrozytensediment wurden 500 µl abpipettiert und durch Zugabe von 500 µl Aqua dest. mit Hilfe eines Vortex-Mischers (Reax 1D, Heidolph, Kehlheim) gemischt und lysiert. Die so vorbereiteten Proben wurden dann bei -20 °C gelagert. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden alle Proben gemeinsam flammenphotometrisch bestimmt (ATM 5050, Eppendorf, Hamburg).

2.5 Osmotische Resistenz

Die Bestimmung der osmotischen Resistenz erfolgte nach durchgeführtem Testansatz photometrisch (Ultrospec III, Fa. Pharmacia LKB, Biochrom, Freiburg) und rechnerisch mit einem Softwareprogramm (R. Langer, Experimentelle Chirurgie, Universität Würzburg).

2.5.1 Theoretische Grundlagen

Erythrozyten sind aufgrund ihrer permeablen Membran in der Lage, Ionen und Wasser entsprechend dem osmotischen Gradienten aus der Umgebung aufzunehmen oder abzugeben. In einem hypotonen Milieu nimmt die Zelle aufgrund des Konzentrationsgefälles Wasser auf (Müller-Plathe 1955). Dadurch ändert sich das Erythrozytenvolumen und die Zelle nimmt zunehmend die Form

einer Kugel an. Wird ein bestimmtes Volumen überschritten, dann platzt die Zelle und der Blutfarbstoff Hämoglobin tritt aus. Die Menge des ausgetretenen Hämoglobins kann photometrisch bestimmt werden und gibt, im bezug auf das Gesamthämoglobin, eine Meßgröße für die osmotische Resistenz an, die gleichzeitig mit der mechanischen Resistenz korreliert.

2.5.2 Meßprinzip

Die Konzentration des bei der Hämolyse ausgetretenen Hämoglobins wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 546 nm gegen einen Leerwert gemessen. Die osmotische Hämolyse wird dann über nachfolgende Beziehung bestimmt:

$$\text{freies Hämoglobin} \times 100 / \text{Gesamthämoglobin}$$

(freies Hämoglobin = Hämoglobin des Überstandes)

Mit Hilfe des o.g. Software-Programms wurde die NaCl-Konzentration bestimmt, bei der 50 % der Erythrozyten lysiert waren sowie das Flächenintegral unter der Hämolysefunktion als weiteres Maß für die Fragilität der Erythrozytenmembran berechnet. Die Homogenität der untersuchten Erythrozytenpopulation kann anhand der inversen Steigung im 50 %-Hämolysepunkt bestimmt werden.

2.5.3 Testdurchführung

Zur Erstellung der osmotischen Reihe wurden in zwölf Reagenzgläser je 10 ml NaCl-Lösung vorpipettiert, und zwar in absteigender Konzentration von 9 bis 1 g NaCl/l. Zu der Vorlage wurden je 100 µl einer Erythrozytensuspension gegeben, und der Testansatz 20 Minuten bei einer Temperatur von 20 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz zehn Minuten bei 1700 g (entspricht 2810 U/min) zentrifugiert und der hämolysierte Überstand photometrisch gegen den Leerwert bei 9 g NaCl/l im Photometer (Ultrospec III, Fa. Pharmacia LKB Biochrom, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 546 nm gemessen. Der Überstand der mit 10 ml aqua dest. versetzten Erythrozytensuspension zeigte die totale Hämolysen und war somit gleichzusetzen mit dem totalen Hämoglobingehalt.

2.5.4 Auswertung

Die Bestimmung der osmotischen Hämolysen erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{fHb \times 100}{tHb} = H$$

H: osmotische Hämolysen

fHb: freies Hb

tHb: totale Hämolysen

Die Bestimmung der übrigen Werte erfolgte wie oben beschrieben.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung sämtlicher Messwerte wurde mit Hilfe einer Statistiksoftware (Microsoft Excel 97) durchgeführt. Dabei wurden zunächst Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt. Der Wilcoxon-Test wurde zum nichtparametrischen Vergleich gepaarter, voneinander unabhängiger Stichproben eingesetzt, um Signifikanzen im Paarvergleich zu testen.

Mit Hilfe des Friedman-Tests wurden signifikante Änderungen der gemessenen Werte im zeitlichen Verlauf überprüft. Als Signifikanzniveau wurde in beiden Tests ein Wert von $p < 0,05$ angenommen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Adenosintriphosphat (ATP)

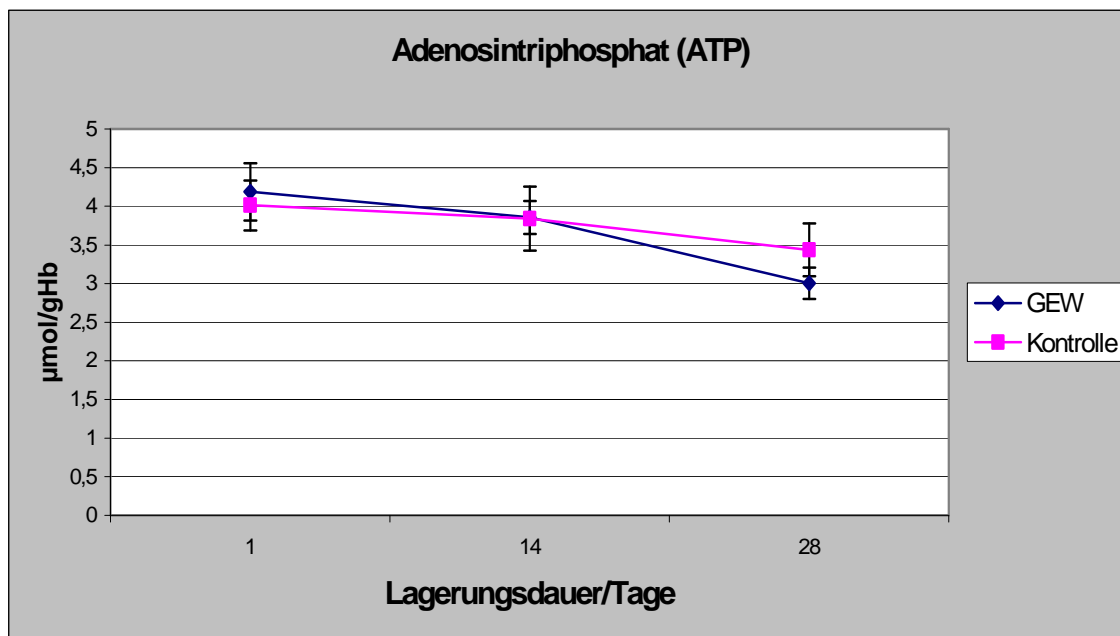


Abbildung 3: ATP-Konzentration während der Lagerung von 28 Tagen.

In der Abbildung werden Mittelwerte und Standardabweichung ($\bar{x} \pm SD$ aus $n = 16$ Versuchen) dargestellt.

Abfallende ATP-Konzentrationen in beiden Aufbereitungen, mit kontinuierlichem Abfall bei der ungewaschenen Kontrollgruppe.

Die ATP-Konzentrationen waren am 1. Meßtag in den gewaschenen EK signifikant höher als in der ungewaschenen Kontrolle. Am 14. Meßtag waren die ATP-Konzentrationen von den beiden Präparationen nahezu gleich, und am 28. Meßtag lag die ATP-Konzentration der mit SAG-M gewaschenen Probe signifikant unter dem Wert der ungewaschenen Probe.

Zwischen den einzelnen Meßtagen sowie zwischen Ausgangs- und Endkonzentrationen fanden sich bei gewaschenen und ungewaschenen Erythrozytenkonzentraten signifikante Unterschiede.

3.2 Hämolyserate

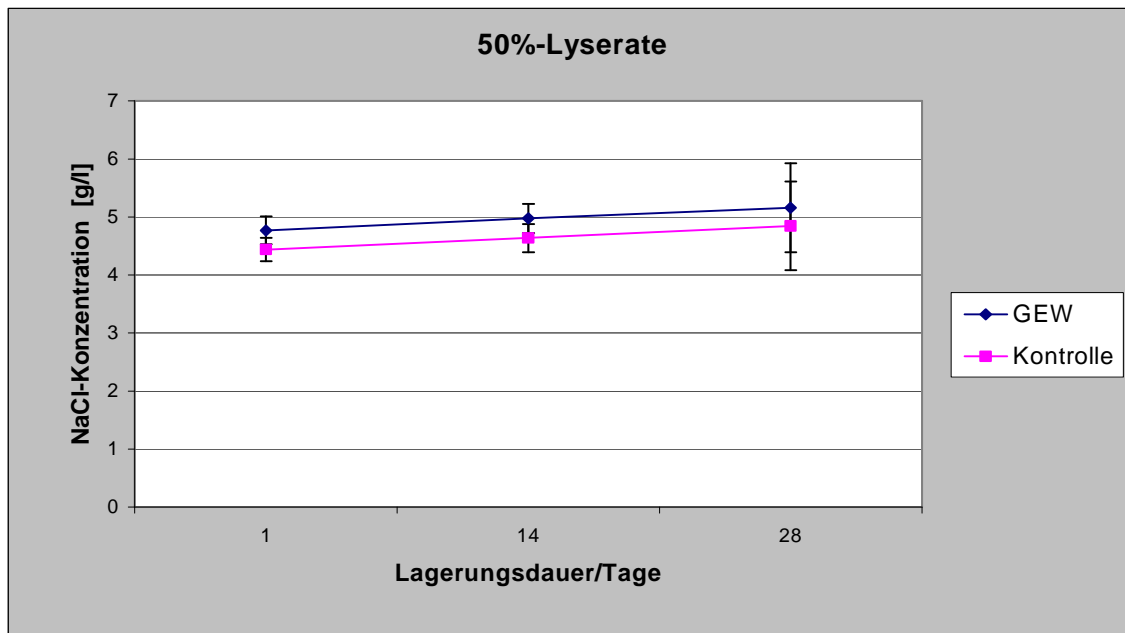


Abbildung 4: 50%-ige Hämolyserate während der Lagerung von 28 Tagen
 In der Abbildung werden Mittelwerte und Standardabweichung ($\bar{x} \pm SD$ aus $n = 16$ Versuchen) dargestellt.

Steigende Hämolyse in beiden Aufbereitungen bei zunehmender Lagerungsdauer. Die Ausgangshämolyserate an Tag 1 ist bei den gewaschenen EK höher als bei den ungewaschenen Kontroll-EK. Der Hämolyseanstieg verläuft nahezu parallel und linear.

Je niedriger die Kochsalzkonzentration, bei der 50 % der Erythrozyten lysiert sind, desto höher ist die osmotische Stabilität der Zellen. Eine Hämolyserate von 50 % war bei den mit SAG-M gewaschenen Erythrozytenkonzentraten am 1. Meßtag bei einer mittleren NaCl-Konzentration von 4,76 g/l zu messen, im Vergleich zu einer NaCl-Konzentration von 4,43 g/l bei der Kontrollgruppe. Damit war am 1. Meßtag ein signifikanter Unterschied der Hämolyserate beider Gruppen festzustellen.

Nach 14 Tagen Lagerung zeigte sich bei den mit SAG-M gewaschenen und gelagerten EK eine 50%-ige Hämolyse bei einer NaCl-Konzentration von 4,97 g/l im Mittel, bei den ungewaschenen Kontrollerythrozyten bei 4,63 g/l. Somit war auch nach 14 Tagen Lagerung die Salzstabilität zwischen beiden EK-Präparationen signifikant verschieden.

Nach 28 Tagen lag die 50%-ige Hämolyserate bei den gewaschenen Erythrozyten bei einer NaCl-Konzentration von 5,16 g/l, bei den ungewaschenen Kontrollerythrozyten bei 4,84 g/l. Der Unterschied war signifikant.

Der Anstieg der NaCl-Konzentration, bei der die Erythrozyten zu 50 % hämolysierten, war von Tag 1 bis Tag 28 ebenfalls signifikant, sowohl bei den gewaschenen wie auch bei den ungewaschenen EK-Präparationen. Der relative Vergleich beider Gruppen zeigt eine identische Verschlechterung der Salzstabilität.

3.3 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG)

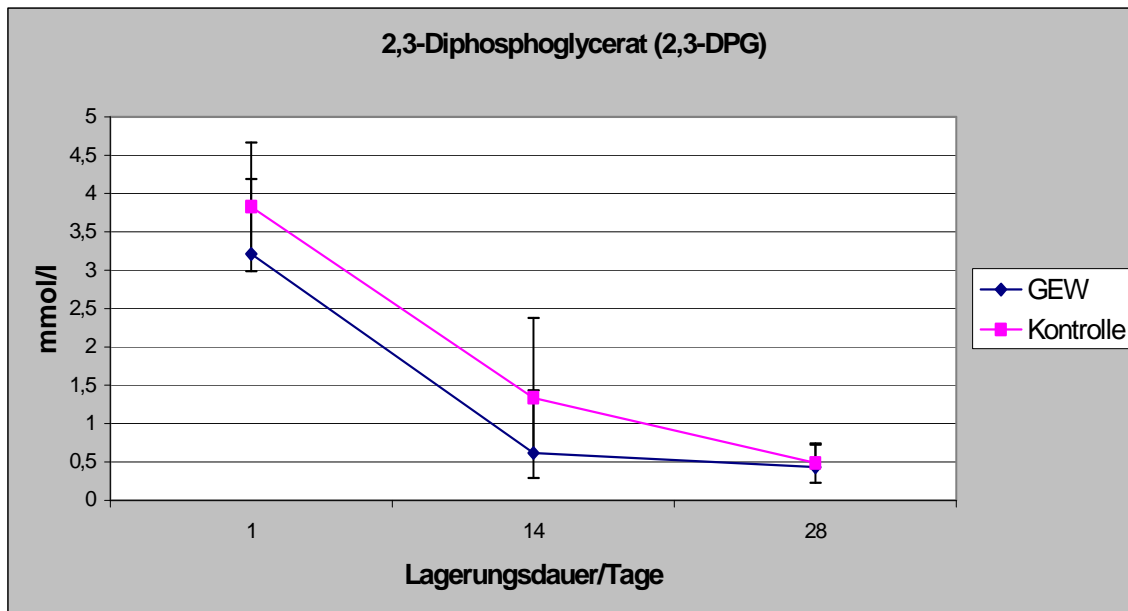


Abbildung 5: 2,3-DPG-Konzentration während der Lagerungsdauer von 28 Tagen.

In der Abbildung werden Mittelwerte und Standardabweichung ($\bar{x} \pm SD$ aus $n = 16$ Versuchen) dargestellt.

Die 2,3-DPG-Konzentration war am 1. und 14. Messtag in den gewaschenen Erythrozytenkonzentraten signifikant niedriger als in den ungewaschenen Kontroll-EK. Ein stetiger Abfall der 2,3-DPG-Konzentration bis zum 28. Meßtag ist bei beiden EK-Aufbereitungen zu erkennen.

Nach 28 Tagen Lagerungsdauer waren die 2,3-DPG-Konzentrationen in beiden EK-Aufbereitungen nicht mehr signifikant verschieden.

Während des gesamten Meßzeitraums von 28 Tagen zeigten sich bei beiden EK-Präparationen zwischen den einzelnen Meßtagen signifikante 2,3-DPG-Konzentrationsunterschiede. Die 2,3-DPG-Meßwerte der gewaschenen EK-Präparation zeigten von Tag 1 bis Tag 14 einen Abfall auf 19,2 % des Ausgangswertes und von Tag 1 bis 28 einen Abfall auf 13,4 %, bezogen auf den Ausgangswert.

Bei den ungewaschenen Kontrollerythrozyten fielen die 2.3-DPG-Werte von Tag 1 bis Tag 14 auf 34.7 % des Ausgangswertes und nach weiteren 14 Tagen Lagerung auf 12.6 % des Ausgangswertes ab.

3.4 pH-Wert extrazellulär

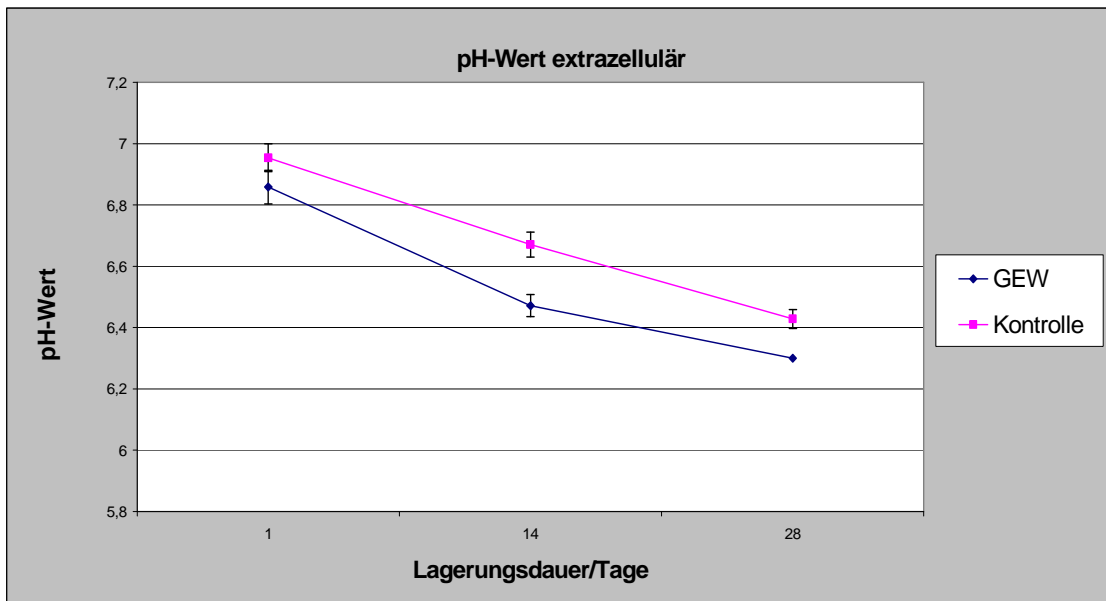


Abbildung 6: Extrazellulärer pH-Wert während der Lagerung von 28 Tagen.

In der Abbildung werden Mittelwerte und Standardabweichung ($\bar{x} \pm SD$ aus $n = 16$ Versuchen) dargestellt.

Der pH-Wert im Extrazellulärraum in den gewaschenen EK war bereits am 1. Meßtag signifikant niedriger als in den ungewaschenen Kontrollpräparaten. Auch an den Meßtagen 14 und 28 waren die extrazellulären pH-Werte in den mit SAG-M gewaschenen und gelagerten Proben signifikant niedriger als in den ungewaschenen Kontrollen. Die pH-Werte der gewaschenen EK-Aufbereitungen waren am Meßtag 28 kleiner oder gleich einem pH-Wert von 6.3 und somit an oder unter der Nachweisgrenze unserer Meßmethode.

Im zeitlichen Verlauf waren sowohl bei den gewaschenen wie auch bei den ungewaschenen Kontrollen signifikante Unterschiede zu erkennen.

3.5 Natrium intrazellulär

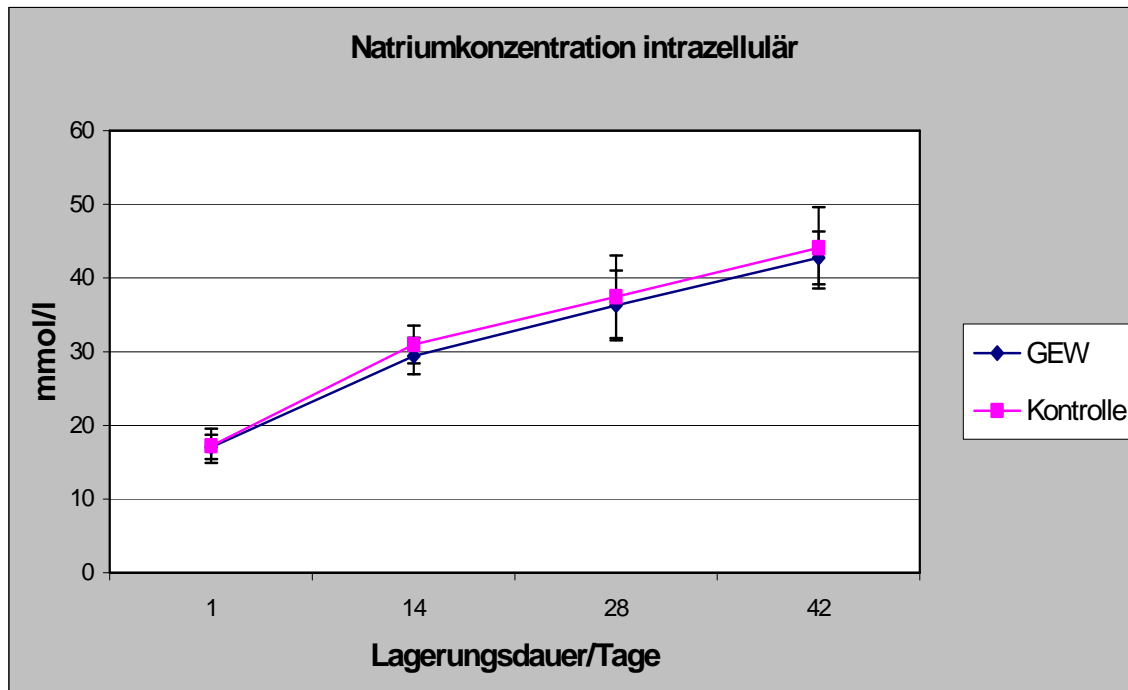


Abbildung 7: Intrazelluläre Natriumkonzentration während einer Lagerungsdauer von 42 Tagen.

In der Abbildung werden Mittelwerte und Standardabweichung ($\bar{x} \pm SD$ aus $n = 16$ Versuchen) dargestellt.

Die Natriumkonzentrationen waren über einen Messzeitraum von 42 Tagen in beiden Präparationen nahezu parallel ansteigend. Die mittlere Natriumkonzentration intrazellulär war am 1. Meßtag bei den mit SAG-M gewaschenen EKs 17,05 mmol/l im Vergleich mit den ungewaschenen Kontrollen mit 17,21 mmol/l nicht signifikant unterschiedlich. Nach weiteren 14, 28 und 42 Tagen Lagerung zeigten sich bei den Messungen der intrazellulären Natriumkonzentrationen bei beiden EK-Aufbereitungen weiterhin keine signifikanten Unterschiede. Es war ein stetiger Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentrationen zu erkennen, der bei gewaschenen und ungewaschenen EKs ab Tag 14 nahezu parallel verlief. Der Anstieg der Natriumkonzentration im Intrazellularraum war von Tag 1 bis Tag 14 am

ERGEBNISSE

deutlichsten und betrug fast 70% des Ausgangswertes. An den folgenden Meßtagen war der Anstieg geringer, der relative Anstieg lag bei etwa 20% zwischen den einzelnen Meßtagen. Der intrazelluläre Anstieg der Natriumkonzentration war im zeitlichen Verlauf sowohl bei den gewaschenen wie auch ungewaschenen Erythrozytenpräparationen signifikant.

3.6 Natrium extrazellulär

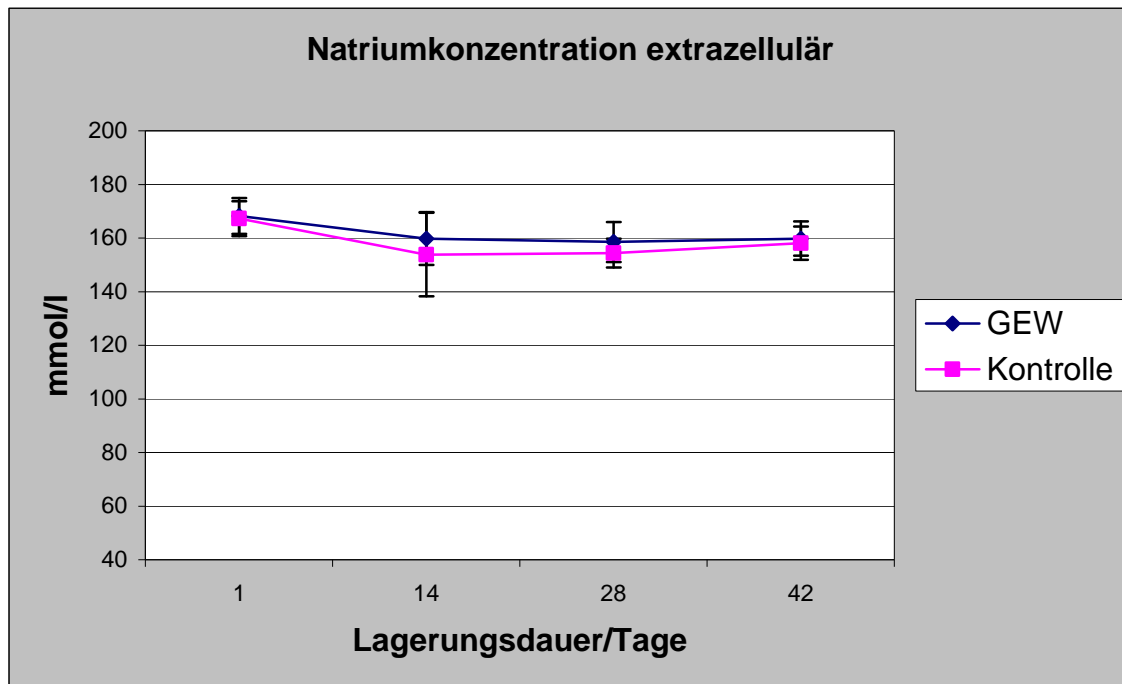


Abbildung 8 Extrazelluläre Natriumkonzentration während einer Lagerungsdauer von 42 Tagen.

In der Abbildung werden Mittelwerte und Standardabweichung ($\bar{x} \pm SD$ aus $n = 16$ Versuchen) dargestellt.

Während der ersten 14 Tage zeigte sich ein Abfall der extrazellulären Natriumkonzentration, dann blieb die Natriumkonzentration in den gewaschenen EKs nahezu konstant. In der Kontrollgruppe zeigte sich tendenziell ein geringer Anstieg von Tag 14 bis Tag 42.

Die Natriumkonzentration im Extrazellulärraum war an Meßtag 1 bei gewaschenen und ungewaschenen Erythrozytenkonzentraten nicht signifikant unterschiedlich (Mittel SAG-M: 168,26 mmol/l; Mittel CPD: 167,25 mmol/l). An den Meßtagen 14 und 28 zeigte sich hingegen ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,05$). Am Tag 42 waren die Natriumkonzentrationen wiederum nicht signifikant unterschiedlich. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich bei den gewaschenen Präparationen ein langsamer Abfall der extrazellulären

Natriumkonzentration von Tag 1 bis Tag 28. Von Tag 28 bis Tag 42 war wieder ein geringer Anstieg zu erkennen. Im Verlauf war der Natriumkonzentrationsabfall allerdings nicht signifikant.

Bei den ungewaschenen Erythrozytenkonzentraten war ein Natriumkonzentrationsabfall von Tag 1 bis Tag 14 zu erkennen, von Tag 14 bis Tag 42 allerdings wieder ein minimaler Anstieg. Insgesamt waren auch hier im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Änderungen zwischen den einzelnen Meßtagen zu verzeichnen.

3.7 Kalium intrazellulär

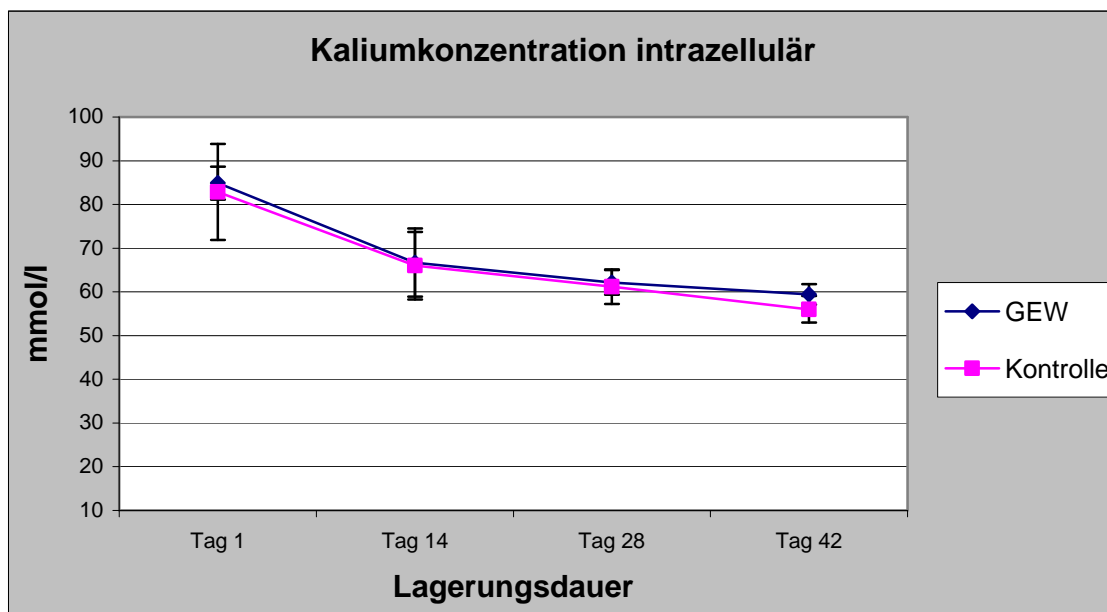


Abbildung 9 Intrazelluläre Kaliumkonzentration während einer Lagerungsdauer von 42 Tagen.

In der Abbildung werden Mittelwerte und Standardabweichung ($\bar{x} \pm SD$ aus $n = 16$ Versuchen) dargestellt.

Die intrazelluläre Kaliumkonzentration beider Aufbereitungen fallen nahezu parallel bis Tag 28 ab. Am steilsten ist der Abfall von Tag 1 bis Tag 14. Von Tag 14 bis Tag 42 ist der Kaliumabfall in beiden EK-Aufbereitungen geringer.

Die intrazelluläre Kaliumkonzentration (mmol/l) war am 1. Meßtag bei beiden EK-Präparationen nahezu identisch. Nach 14, 28 und 42 Lagerungstagen zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden EK-Aufbereitungen. Der stärkste relative Abfall der intrazellulären Kaliumkonzentration mit ca. 30% war während der ersten 14 Tage zu verzeichnen. Im weiteren zeitlichen Verlauf war der Abfall geringer und betrug zwischen 5% und 10%. Insgesamt war der intrazelluläre Kaliumabfall der gewaschenen und ungewaschenen Erythrozytenkonzentrationen von Beginn bis zum Ende der Messungen signifikant.

3.8 Kalium extrazellulär

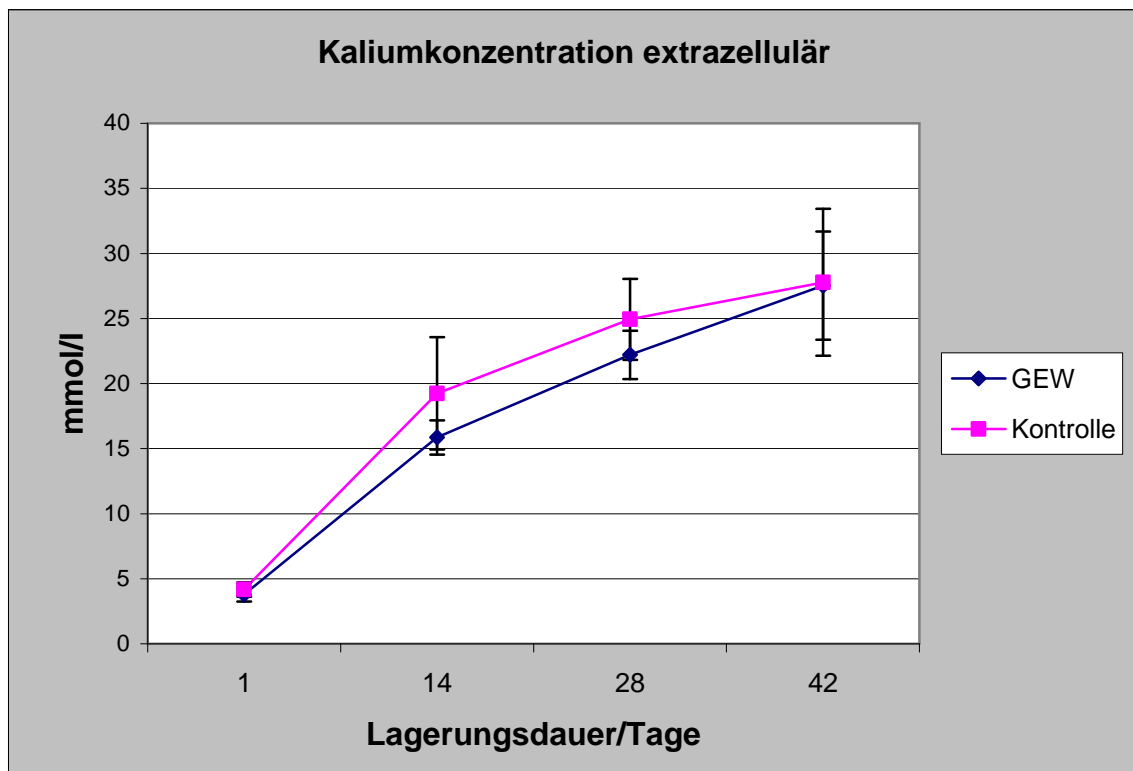


Abbildung 10 Extrazelluläre Kaliumkonzentration (mmol/l) während einer Lagerungsdauer von 42 Tagen.

In der Abbildung werden Mittelwerte und Standardabweichung ($\bar{x} \pm SD$ aus $n = 16$ Versuchen) dargestellt.

Die Kaliumkonzentrationen steigen in beiden Aufbereitungen bis Tag 42 an, wobei der deutlichste Anstieg während der ersten 14 Tage zu erkennen ist.

Die Kaliumkonzentrationen im Extrazellulärraum waren am 1. Tag sowohl bei den GEW als auch bei den ungewaschenen Kontrollerythrozyten im Normbereich eines in vivo Blutes. Bei den gewaschenen Erythrozyten war die Kaliumkonzentration am Tag 1 niedriger als bei den ungewaschenen EK, die Differenz war signifikant ($p < 0,05$). Während der Lagerung stiegen die extrazellulären Kaliumkonzentrationen deutlich an. Nach 14 und 28 Tagen waren die gemessenen Kaliumwerte extrazellulär signifikant unterschiedlich. Am Tag 42 gab es zwischen den beiden Erythrozytenaufbereitungen keine signifikanten Konzentrationsunterschiede. Im zeitlichen Verlauf von 42 Tagen Lagerung erkennt man den steilsten Anstieg der Kaliumkonzentration im Extrazellulärraum von Tag 1 bis Tag 14. Dabei war der Anstieg der ungewaschenen Kontrolle in diesem Zeitabschnitt steiler. Von Tag 14 bis 28 wurde der Anstieg in der ungewaschenen Kontrolle wieder flacher. Ein nahezu paralleler Anstieg der Kaliumkonzentration in beiden EK-Präparationen ist zu erkennen. Bis zum letzten Meßtag, Tag 42, zeigte sich ebenfalls ein flacher Anstieg bei beiden EK-Aufbereitungen. Die Kaliumkonzentrationsunterschiede waren am Ende des Meßzeitraumes nicht mehr signifikant.

Im gesamten zeitlichen Verlauf erkennt man einen signifikanten Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration in beiden EK-Präparationen.

3.9 Kohlendioxidpartialdruck (pCO₂)

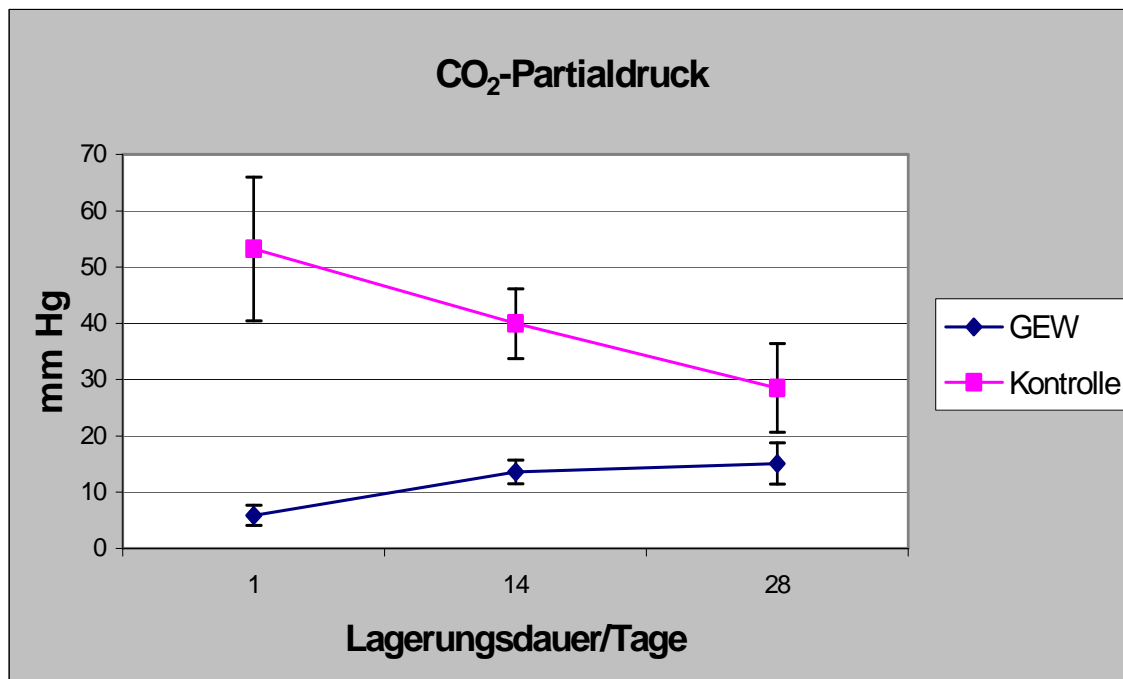


Abbildung 11 Kohlendioxidpartialdruck (pCO₂) während einer Lagerungsdauer von 28 Tagen.

In der Abbildung werden Mittelwerte und Standardabweichung ($\bar{x} \pm SD$ aus $n = 16$ Versuchen) dargestellt.

Starker pCO₂-Abfall bei den ungewaschenen Kontroll-EK nach 28 Tagen. Umgekehrter Verlauf d.h. langsamer Anstieg des pCO₂ von Tag 1 bis Tag 28 bei den mit SAG-M gewaschenen EK.

Der Kohlendioxidpartialdruck lag bei den mit SAG-M gewaschenen Erythrozytenkonzentraten am 1. Meßtag bei einem Mittelwert von 5,9 mmHg und damit weit unter dem physiologischen Normalwert von 38–42 mmHg (Düsing 1994) Im Vergleich dazu waren die pCO₂-Werte bei den Kontrollen erheblich höher und lagen bei einem Mittelwert von 53,2 mmHg.

Die pCO₂-Ausgangswerte beider EK-Präparationen zeigten somit höchst signifikante Unterschiede ($p < 0,001$). An den darauffolgenden Meßtagen 14

und 28 waren die Unterschiede der $p\text{CO}_2$ -Partialdrucke in beiden EK-Aufbereitungen ebenfalls signifikant. Bei den mit SAG-M gewaschenen zeigte sich von Tag 1 bis Tag 14 ein $p\text{CO}_2$ -Anstieg von 43,38%, von Tag 14 bis Tag 28 ein weiterer Anstieg von 12.5%.

Bei den ungewaschenen Kontrollerythrozyten kam es hingegen zu einem langsamen und gleichmäßigen Absinken des $p\text{CO}_2$ von Tag 1 bis Tag 28. Am Tag 28 hatten sich die $p\text{CO}_2$ -Werte der beiden Präparationen angenähert, waren jedoch noch immer signifikant verschieden.

Ebenfalls signifikante Unterschiede zeigten sich bei den $p\text{CO}_2$ -Messungen in beiden EK-Präparationen im zeitlichen Verlauf von Tag 1 bis Tag 28.

3.10 Sauerstoffpartialdruck (pO₂)

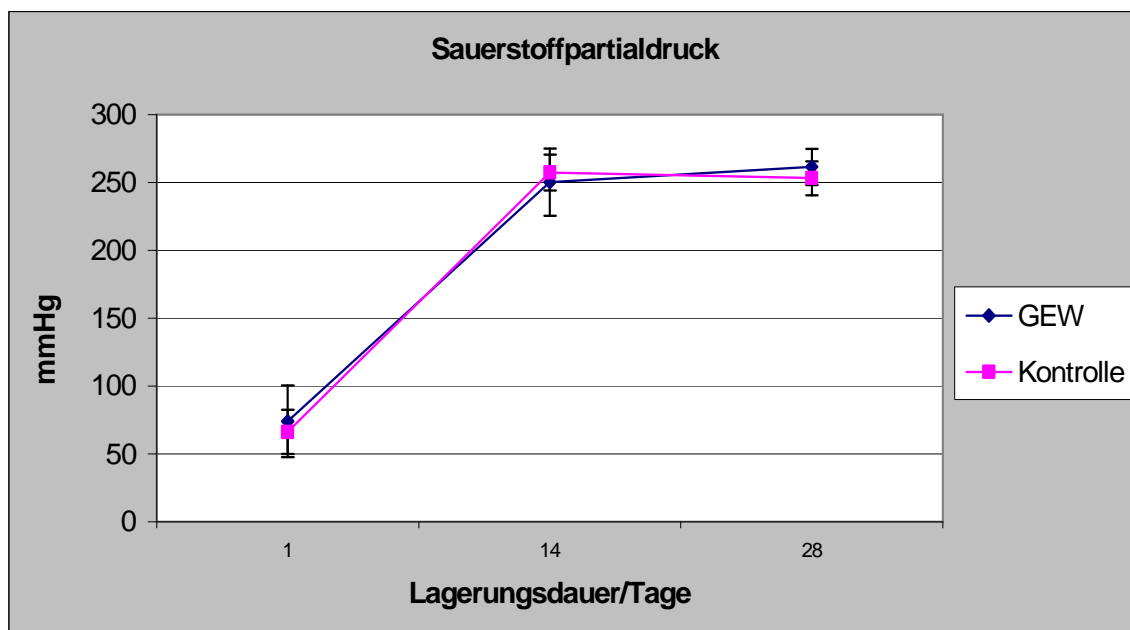


Abbildung 12 Sauerstoffpartialdruck (pO₂) während der Lagerung von gewaschenen und ungewaschenen Eks

In der Abbildung werden Mittelwerte und Standardabweichung ($\bar{x} \pm SD$ aus $n = 16$ Versuchen) dargestellt.

Der Sauerstoffpartialdruck zeigt in beiden EK-Aufbereitungen einen nahezu parallelen Kurvenverlauf. Ein starker pO₂-Anstieg ist in den ersten 14 Tagen zu erkennen. Von Tag 14 bis 28 bleibt der pO₂ in beiden EK-Präparationen nahezu konstant.

Der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) war am Meßtag 1 bei den mit SAG-M gewaschenen Erythrozytenkonzentraten mit einem pO₂-Mittelwert von 74,03 mmHg (physiologischer Normbereich 70-104 mmHg) höher als bei den ungewaschenen Kontrollerythrozyten (Mittelwert 66,14 mmHg). Der Unterschied an Tag 1 war mit $p < 0.001$ signifikant. Von Tag 1 bis Tag 14 zeigte sich in beiden Präparationen ein steiler Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks auf ein Dreifaches der Ausgangsdrücke. Der Unterschied zwischen gewaschenen und

ungewaschenen EK-Präparationen bezüglich des pO_2 war an Tag 14 nicht mehr signifikant. Zwischen dem 14. und 28. Tag ergaben sich in beiden Gruppen keine relevanten Veränderungen des pO_2 mehr.

Zwischen den beiden EK-Präparationen war an Tag 28 wieder ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) des Sauerstoffpartialdrucks zu erkennen. Erneut lagen hier höhere Werte für die gewaschenen EK vor.

Im zeitlichen Verlauf zwischen Tag 1 und Tag 28 waren die pO_2 -Drücke bei beiden EK-Aufbereitungen signifikant angestiegen.

3.11 Sterilitätsprüfung

Alle Proben sind im Mikrobiologischen Institut auf Kontamination überprüft worden. Sie erwiesen sich als steril und wurden somit als unbedenklich einsetzbar befundet.

4 DISKUSSION

4.1 Physiologische Erythrozytenalterung

Die Lebenszeit von Erythrozyten unter physiologischen Bedingungen beträgt 110–130 Tage, danach werden sie in Zellen des RES in Milz, Leber und Knochenmark abgebaut. Die Bestimmung der Erythrozytenlebensdauer kann durch deren radioaktive Markierung mit Cr^{51} oder Fe^{59} bestimmt werden. Sowohl innere Faktoren, wie Aktivitätsminderung erythrozytärer Enzyme mit ihren Folgen auf den Stoffwechsel sowie äußere Faktoren, wie phagozytäre Wirkung von Milz und retikuloendotheliale System, führen zu einer eng begrenzten Lebensdauer (Rapoport 1977, Petrides 1990)

4.2 Erythrozytenkonzentrate und ihre Veränderungen während der Lagerung in einer Additivlösung

Die in vivo ablaufenden metabolischen Prozesse und damit verbundenen rheologischen Veränderungen des Blutes aufgrund der Alterung der Erythrozyten lassen sich auch in vitro nachvollziehen. Die Aktivitätsminderung der erythrozytären Enzyme bedingt eine Abnahme des Gesamtenergiestoffwechsels. Es kommt zu Veränderungen der Membran und ihrer Eigenschaften und des Zellvolumens und -oberfläche (Wagner et al 1986).

Da in-vitro-Bedingungen den in-vivo-Verhältnissen nur unvollständig entsprechen, laufen die Veränderungen während der Lagerung deutlich schneller ab.

Der Erythrozytenmetabolismus, der überwiegend anaerob abläuft, liefert als Endprodukt Laktat. Da dieses von dem Puffersystem der Erythrozyten und dem der zugesetzten Additivlösung nicht ausreichend neutralisiert werden kann, sinkt der pH-Wert in der Konserve. Dies führt zu einer Abnahme von 2,3-DPG und damit zu einer Linksverschiebung der Sauerstoffdissoziationskurve.

Der pH und speziell der pH-Abfall gilt als limitierender Faktor für den Erythrozytenstoffwechsel und hat konsekutive eine verminderte ATP-Produktion zur Folge (Feo et al 1977), was wiederum die Lebensdauer der transfundierten EK verkürzt (Lachant et al 1984).

Mit dem ATP-Abfall kommt es zu konsekutiven Veränderungen der osmotischen Verhältnisse (Bernstein 1959, Leterrier et al 1993).

Die Na^+/K^+ -Pumpe ist nicht mehr in vollem Umfang wirksam, was zu Veränderungen der Ionenverhältnisse zwischen Intra- und Extrazellulärraum führt. Es kommt zum Wassereinstrom in die Zelle und zusätzlich zu einem Membranverlust durch Bildung von Mikrovesikeln (Allan et al 1976). Das Ergebnis ist eine Erhöhung des Volumen/Oberflächenverhältnisses (Beutler et al 1982, Mollison et al 1993). Daraus resultiert zum einen eine Änderung der Fließeigenschaften aufgrund von Viskositätsänderungen, zum anderen ändert sich die osmotische Fragilität (Bernstein 1959, Leterrier et al 1993).

Neben den genannten, kommt es noch zu einigen anderen Veränderungen, vor allem an der Erythrozytenmembran, die sich negativ auf die Lagerungsfähigkeit der Erythrozyten auswirken (Oberflächenladung, Bildung antigener Strukturen etc., Tozzi-Ciancarelli et al 1992, Gareau et al 1992).

Durch die Auswahl von geeigneten Lagerungsmedien (Additivlösungen) und ggf. Waschlösungen sowie einer optimalen Lagerungstemperatur wird versucht, die beschriebenen Lagerungsschäden soweit wie möglich zu reduzieren und die Haltbarkeit der EK entsprechend zu verlängern.

4.3 Beurteilung der Qualität von Erythrozytenkonzentraten

Nach den Richtlinien der Bundesärztekammer (1996) wird für gelagerte Erythrozytenpräparate am Ende der Laufzeit eine 24 h-Überlebensrate von mindestens 75% gefordert. Die posttransfusionelle, das heißt „**in-vivo-Überlebensrate**“ wird anhand Cr^{51} -markierter Erythrozyten gemessen. Zur „**in-vitro-Qualitätsbeurteilung**“ können folgende Parameter als Maß herangezogen werden:

- ATP-Konzentration
- 2,3-DPG-Konzentration
- Hämolysegrad ($< 0,8\%$)
- Rheologische Eigenschaften

4.4 Biochemische und osmotische Veränderungen bei gelagerten EK

4.4.1 Adenosintriphosphat (ATP)

Beim Abbau der Glukose entsteht in mehreren enzymatischen Schritten Laktat und zwei ATP. Das dabei synthetisierte ATP liefert die nötige Energie für die membranständigen ATPasen, die die Na^+ , K^+ sowie Mg^+ und Ca^{2+} -Konzentrationen zwischen Intra- und Extrazellulärraum aufrecht erhalten.

Dem ATP kommt somit in der Zelle eine zentrale Bedeutung zu, da durch aktive Stoffwechselfvorgänge die physiologischen Ionenkonzentrationen und die Membranstruktur aufrechterhalten werden können. In Arbeiten von Dern et al (1967), Weed et al (1969) und Lachant et al (1984) wurde gezeigt, dass ATP als phosphathaltiger Energieträger in direktem Zusammenhang steht mit der Zellform und Deformabilität sowie der In-vivo-Überlebenszeit der transfundierten Erythrozyten.

ATP wird also für die Phosphorylierung der Membranproteine und -lipide benötigt, wodurch eine physiologische Zellform und eine normale Verformbarkeit der Zellen gewährleistet wird (Weed et al. 1969).

Des Weiteren dient ATP auch der Phosphorylierung weiterer Glukose, die wieder in der Glykolyse verstoffwechselt wird (Rossi et al 1998).

Untersuchungen dahingehend haben ergeben, dass unter einem Wert von 1,5 $\mu\text{mol ATP/gHb}$ die Lebensdauer deutlich vermindert ist (Dern et al 1967). Bei zu niedrigen ATP-Spiegeln können die Erythrozyten nicht mehr genügend ATP phosphorylieren und der Energiestoffwechsel kommt zum Erliegen (Mollison et al 1993).

Weiterhin sind zahlreiche zelluläre Schutzmechanismen gegen oxidative Schäden von einem ausreichend hohen ATP-Gehalt abhängig (Lachant et al 1984, Wolfe 1989).

Bei den Messungen der ATP-Konzentrationen ergaben sich nach 28 Tagen Lagerungsdauer sowohl bei gewaschenen wie auch bei ungewaschenen Erythrozytenkonzentraten noch immer Werte von 3 bzw. 3,3 $\mu\text{mol/g Hb}$. Wie bereits beschrieben, kam es während der ersten 14 Lagerungstage zu einem Abfall der ATP-Konzentrationen in beiden Präparationen, bei signifikant niedrigeren Ausgangskonzentrationen an Tag 1 in den ungewaschenen Konzentraten. In den gewaschenen EK sank die ATP Konzentration auf 92%, in den unbehandelten Kontrollen auf 95% der ATP-Ausgangskonzentration. Nach weiteren 14 Tagen Lagerung sank die ATP-Konzentration der mit SAG-M gewaschenen und gelagerten Erythrozyten auf nur noch ca. 72% der Ausgangskonzentration, während die ungewaschenen Kontrollen einen geringeren Abfall auf ca. 86% der ursprünglichen ATP-Konzentration zeigten. Die Tatsache, dass die ATP-Konzentration am Anfang bei den gewaschenen Erythrozyten signifikant höher ist, hat zunächst überrascht, lässt sich möglicherweise durch das der Waschlösung zugesetzte Adenin erklären, welches ja der ATP-Synthese im Erythrozyten dient (Nakao et al 1982, Simon et al 1977). Gegen diese Hypothese spricht allerdings die Tatsache, dass der pH-Wert in den mit SAG-M gewaschenen EK niedriger war als in den

ungewaschenen Kontrollen, was normalerweise eine Verringerung der ATP-Konzentration zur Folge hat, da die ATP-liefernden Schritte der Glykolyse stark vom pH-Wert abgänglich sind. Die im sauren Bereich auftretende Enzymhemmung von Phosphofruktokinase und nachfolgend Hexokinase, ziehen eine verminderte ATP-Bereitstellung nach sich.

Der relativ starke ATP-Abfall bei den gewaschenen EK zum Ende der Meßperiode läßt sich u.a. darauf zurückführen, dass der phosphathaltige CPD-Stabilisator entfernt wurde und der pH deutlich abgesunken war und SAG-M einen sehr niedrigen pH (4,8) hat .

Durch das Entfernen von CPD kommt es ferner zu einer sogenannten Substratverarmung. (Glucosemenge in CPD: 25.5 g/l, in SAG-M: 9.0 g/l).

Neben anderen intrazellulären Veränderungen ist nach Högman et al (1969) das Ausmaß des Abfalls der ATP-Konzentration in den Erythrozyten mitentscheidend für die Überlebensrate post transfusionem. Beutler und West (1983) fanden während einer 42-tägigen Lagerung von Erythrozyten eine gute Korrelation zwischen ATP und der in vivo Überlebensrate, die nach 42 Tagen, jedoch nicht mehr nach 49 Tagen Lagerung, nachweisbar war.

4.4.2 Hämolyse

Die Hämolyserate der Erythrozyten gibt das Ausmaß der Membranschädigung an, das den Austritt von Hämoglobin zur Folge hat.

Es gibt verschiedene Ursachen der Hämolyse (Rapoport 1977):

- **osmotische Hämolyse:** in hypotonem Milieu
- **Membranhämolyse:** durch direkte Zellmembranschädigung (z.B. durch Netzmittel, Fettlöser, eiweißfällende Stoffe)

- **Stoffwechselhämolyse:** durch Abfall von ATP und damit des Glutathions kommt es zur Bildung von Sphärozyten und zur Erhöhung der Rigidität.

Dadurch wird die osmotische Resistenz herabgesetzt.

Während der in-vitro-Lagerung kommt es zur Zunahme der Hämolyse aus oben genannten Gründen. Als Qualitätsgrenzwert wird ein Wert unter 0,8% gefordert (Vorstand und wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer, 1995), das heißt die Hämolyserate sollte am Ende der Lagerung unter 0,8% der Erythrozytenmasse sein.

Die Abbildung 4 zeigt, dass eine 50%-ige Hämolyse bei den gewaschenen EK bereits bei einer NaCl-Konzentration von 4,76 g/l eintritt, bei den ungewaschenen EK erst bei einer solchen von 4,46 g/l. Dieser Unterschied war signifikant. Diese Beobachtung zeigt sich auch an den Tagen 14 und 28. Das heißt, dass zu jedem Meßzeitpunkt die ungewaschenen Erythrozyten trotz eines hypotoneren Milieus eine signifikant geringere Hämolyserate zeigten. Offensichtlich war die biochemische Integrität der Kontrollen besser als die der gewaschenen EK.

Insgesamt zeigt sich ein Anstieg der Hämolyse während der gesamten Lagerung, der bei beiden Präparationen nahezu parallel verläuft. Dieser Verlust an osmotischer Resistenz bei zunehmender Lagerungsdauer korreliert mit der Fragilitätszunahme während der Lagerung (Haradin et al 1969, Leterrier et al 1993). Für die Fragilitätszunahme sind mehrere Faktoren verantwortlich. Von entscheidender Bedeutung ist die Entstehung von Laktat (Beutler et al 1982). Laktat, das aus dem Abbau von Glukose entsteht, wird intrazellulär osmotisch wirksam und setzt die Widerstandsfähigkeit gegenüber osmotischem Stress herab. Ebenfalls osmotisch wirksam ist das 2,3-DPG, das während der gesamten Lagerungsdauer abnimmt, jedoch zu jedem Zeitpunkt in den ungewaschenen EK höher ist. Der Ladungsausgleich und damit verbunden eine Erhöhung der intrazellulären Osmolarität wird in den

SAG-M-Erythrozytenkonzentraten, falls erforderlich, von Chloridionen der SAG-M-Lösung übernommen. Bei den ungewaschenen und in CPD gelagerten EK-Präparationen war ein geringer Ladungsausgleich durch Chloridionen nur während der Aufschwemmung in Kochsalzlösung für die osmotische Resistenzmessung möglich. Mit vielen anderen Faktoren liefert der Chloridausgleich und damit die Erhöhung der Osmolarität einen geringen Beitrag zur Erhöhung der osmotischen Resistenz der Erythrozyten. Merymen (1991) fand heraus, dass die Verwendung einer hypotonen Wasch- und Lagerungslösung die Hämolyse minimieren ließ.

Ein weiterer Faktor, der die Hämolyse beeinflusst, sind die Plasmaproteine. Diese werden von Högman et al (1978) als Schutzproteine für die Zellmembran beschrieben und sollen die Fragilität der Zellen verbessern. Dies unterstützt die Versuchsergebnisse einer geringeren osmotischen Resistenz der gewaschenen EK. Einen weiteren Hinweis für die höhere Salzstabilität der ungewaschenen EK geben die Untersuchungen von Sachs et al (1988). Diese zeigen, dass die osmotische Resistenz von der Zahl der Waschzyklen abhängig ist.

Die Ergebnisse von Kaiser et al (1990) zeigen, dass die mechanischen Belastungen der Waschvorgänge die Membran der roten Blutzellen dahingehend negativ beeinflussen, dass sie fragiler werden. Dies erklärt eine signifikant höhere osmotische Resistenz der ungewaschenen Präparate bereits zu Beginn der Untersuchungen.

Ein weiterer Faktor, der die osmotischen Stabilität beider EK-Präparationen beeinflusst, ist der Hämatokrit. Dieser ist ein Grad dafür, wie dicht gepackt die Zellen gelagert werden. Card et al (1982) zeigte, dass Erythrozyten in Präparaten mit hohem Hämatokrit frühzeitig ihre osmotische Stabilität verlieren und somit eher hämolysieren. Beutler und West (1979) beschreiben in ihren Versuchen ebenfalls einen Verlust der Erythrozytenlebensfähigkeit post Transfusionem bei hohem Hämatokrit.

Abschließend sollte die Bedeutung der Weichmacher im Zusammenhang mit der Fragilitätsbestimmung erwähnt werden. Rock et al (1984) sowie Labow et al

(1987) schreiben dem Weichmacher DEHP diesbezüglich eine protektive Wirkung zu. In einer neueren Studie, die von Manojkumar et al (1999) durchgeführt wurde, um die Veränderungen der Erythrozytenmembran während der Lagerung in verschiedenen Medien zu zeigen, wird der stabilisierende Effekt des Weichmachers DEHP bestätigt. Dieser Effekt wirkt sich allerdings positiv auf beide EK-Präparationen aus.

Der geforderte Grenzwert der Hämolyserate am Ende der Lagerungszeit liegt bei beiden Präparationen nach 14 Tagen Lagerungsdauer noch im Toleranzbereich (< 0,8% der Erythrozytenmasse), übersteigt diesen jedoch nach 28 Tagen Vorstand und wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer, 1995). Die Bestimmung des freien Hämoglobins gibt zwar Information darüber, welcher Teil der gelagerten Erythrozyten schon hämolysiert ist. Mit diesem Parameter läßt sich allerdings keine geeignete Aussage über die Überlebenszeit in vivo machen (Stangel 1996).

4.4.3 2,3-Diphosphoglycerat

Bis 1967 war die Rolle des 2,3-DPG in Erythrozyten weitgehend unbekannt. Erst dann entdeckten Benesch und Benesch sowie Chanutin und Curnish, (1967) den Einfluß des 2,3-DPG auf die Sauerstoffabgabe an das Gewebe.

Eine hohe 2,3-DPG-Konzentration der Erythrozyten ermöglicht eine bessere Sauerstoffabgabe der Erythrozyten an das Gewebe. Dies ist vor allem von sehr großer Bedeutung bei massiven Blutverlusten, bei eingeschränkter Koronarreserve und bei Austauschtransfusionen im Neugeborenenalter. Eine hohe 2,3-DPG-Konzentration der EK bewirkt eine Verbesserung der Koronarfunktion (Dennis et al 1975) und im Neugeborenenalter eine schnellere kardiale Kompensation (Delivoria-Papadopoulos et al 1971).

2,3-DPG entsteht in einem Seitenweg der Glykolyse, dem schon erwähnten Rapoport-Luebering-Shunt, der in vivo 10% ausmacht. Abbau und Neusynthese stehen in einem Fließgleichgewicht, wobei in Versuchen die Abhängigkeit vom

pH-Wert gezeigt werden konnte. Eine Azidose verstärkt den Abbau von 2,3-DPG zu 3-Phosphoglycerat, indem die 2,3-DPG-Phosphatase stimuliert und die Diphosphoglycerat-Mutase gehemmt wird. Eine Erhöhung des pH-Wertes führt zu einer Zunahme der Neusynthese von 2,3-DPG (de Verdier et al 1970), indem die Diphosphoglyceratmutase stimuliert wird.

In den durchgeführten Versuchen konnte eine signifikant niedrigere Ausgangskonzentration von 2,3-DPG in den mit SAG-M gewaschenen EK gezeigt werden. Dies war sowohl am Tag 1 nach den Waschprozessen als auch im weiteren Verlauf, das heißt nach 14 Tagen Lagerungsdauer, zu messen. Nach 28 Tagen Lagerung waren die 2,3-DPG-Konzentrationen in den beiden Präparationen nicht mehr signifikant unterschiedlich. Dies lässt sich mit den analog verlaufenden pH-Wert Kurven erklären.

Der niedrigere pH in den gewaschenen EK kann durch den sauren pH der Additivlösung SAG-M hinreichend erklärt werden. In beiden Präparationen war die 2,3-DPG-Konzentrationen nach 28 Tagen auf etwa 13% der Ausgangskonzentration abgefallen. Durch Waschen mit NaCl-Lösung lässt sich keine Rejuvenation mehr erreichen (Kaiser 1990).

4.4.4 pH-Wert extrazellulär

Der pH-Wert beeinflusst den Erythrozytenmetabolismus entscheidend. Damit sämtliche Stoffwechselforgänge optimal ablaufen können, muss er immer in engen Grenzen gehalten werden. Jedes katalysierende Enzym hat sein eigenes Wirkungsoptimum in einem engen pH-Bereich. Abweichungen davon können eine Reaktion sogar in die umgekehrte Richtung ablaufen lassen (Cleland 1977).

Die Glykolyse in den Erythrozyten läuft bei einem pH von 7,3 und einer Temperatur von 37°C mit maximaler Geschwindigkeit ab (Rapoport 1947; Albrecht et al 1971; Tomada 1977). Dieses pH-Optimum ändert sich, wenn die

Erythrozyten bei 4°C gelagert werden. Wie bekannt ist, liegt der pH von bisher verwendeten Lagerungsmedien bei 4°C bei $7,25 \pm 0,2$. Bei Temperaturen zwischen 15°C und 35°C liegt das pH-Optimum der Glykolyse in den Erythrozyten zwischen 7,8 und 8,5 (Guppy et al 1992). Weiterhin zeigten diese Lagerungsversuche, dass die Glykolyse bei einem pH von 7,67 eineinhalb mal so hoch war wie bei einem pH von 7,36.

Der pH-Wert als solcher verändert sich schon bei einer Temperaturänderung (Raftos et al 1986).

Um für die Lagerung von weitgehend abgetrennten Erythrozyten optimale Bedingungen zu schaffen, muss man das Plasma durch eine Additivlösung ersetzen. Die im Plasma vorhandenen Protein-, Phosphat- und Bicarbonatpuffer (Thews 1987), die als extrazelluläre Puffer in vivo sehr wichtig sind um den pH-Wert in den engen Grenzen zu halten, werden bei gelagerten Erythrozytenkonzentraten durch Citrat und Phosphat der Stabilisator- und Additivlösungen ersetzt.

Die extrazellulären pH-Werte der untersuchten Erythrozytenkonzentrate waren an Tag 1 nach dem Waschen bereits signifikant verschieden. Die gewaschenen EK hatten mit einem pH von 6,85 einen niedrigeren Wert als die ungewaschenen Kontrollen bei einem pH-Wert von 6,95. Am Tag 28 lag der pH-Wert der gewaschenen Konserven an der Messgrenze von 6,3 und bei den Kontrollen bei 6,4. Durch die Waschvorgänge kommt es extra- und intrazellulär zu Änderungen des pH-Wertes. Das stärkere Absinken des extrazellulären pH-Wertes in den gewaschenen EK ist in erster Linie durch das Entfernen des Restplasmas und der CPD-Lösung mit den darin enthaltenen Puffersystemen zu erklären. In den ungewaschenen Kontrollen hingegen verbleibt das zugesetzte CPD und kompensiert die entfernten Plasmapuffer. Das kontinuierliche Absinken des extrazellulären pH-Wertes während der Lagerung beider Präparatearten lässt sich in Abbildung 6 nachvollziehen.

Durch die Waschvorgänge kann, wie Merymen (1991) in diversen Versuchen gezeigt hat, der pH-Wert intra- und extrazellulär mehr oder weniger stark

manipuliert werden. Je nach Zusammensetzung der Waschlösung induzierte sie erheblich unterschiedliche pH-Werte. Die Ursache liegt vermutlich in einem bereits 1975 von Minakami et al beschriebenen Phänomen, dem "Chlorid-Shift": werden Zellen in einer chloridfreien Lösung gewaschen, kommt es aufgrund des Konzentrationsgefälles zu einem Chloridefflux. Um die Elektroneutralität zu bewahren, gelangen Hydroxidionen in den Intrazellularraum. Dabei wird ein Mol Chloridionen mit einem Mol Hydroxidionen ausgetauscht (Meryman et al 1991), wodurch es im Intrazellularraum zu einer Neutralisation der H⁺-Ionen kommt. Das Endresultat ist ein Ansteigen des intrazellulären pH und ein Absinken des extrazellulären pH-Wertes

Das Ausmaß der pH-Wert-Änderung ist neben dem beschriebenen Chlorid-Shift-Effekt zudem von der Anzahl der Waschvorgänge abhängig. Da eine Mehrfachwaschung für die Praxis jedoch ungeeignet erscheint, haben Meryman et al und Matthes et al (1991) versucht, eine Alternativmethode zu entwickeln, bei der man den Effekt des Chloridionen-Shiftes durch den Einsatz von bicompatiblen Adsorbentien erreicht.

Allerdings wird bei letzterem Verfahren selbstverständlich das Restplasma des EK und somit der Proteingehalt nicht reduziert.

4.4.5 Kalium intra- und extrazellulär

Kalium liegt unter physiologischen Bedingungen intrazellulär in einer Konzentration von etwa 100 mmol/l und extrazellulär in einer Konzentration von 3,0–5,5 mmol/l vor. Entlang des Konzentrationsgefälles diffundiert Kalium permanent durch die semipermeable Zellmembran von intra- nach extrazellulär. Gleichzeitig wird Kalium, um den Ladungsausgleich wiederherzustellen, aktiv vom Extrazellularraum ins Innere der Zelle transportiert. Dies geschieht mit Hilfe der membranständigen Na⁺/K⁺-ATPase, wobei Kalium im Austausch gegen Natrium unter Verbrauch von ATP nach intrazellulär gelangt.

Während der Lagerung von Erythrozytenkonzentraten steigt die extrazelluläre Kaliumkonzentration proportional zur Lagerungsdauer an (Michael et al 1975). Wie in den Abbildungen 10 zu sehen ist, nimmt in den durchgeführten Versuchsreihen über einen Zeitraum von 42 Tagen die Kaliumkonzentration im Extrazellulärraum kontinuierlich zu, im Intrazellulärraum nimmt sie parallel dazu entsprechend ab (Abbildung 9). Bei nahezu gleichen Ausgangskonzentrationen von gewaschenen und ungewaschenen Präparaten steigen die extrazellulären Kaliumkonzentrationen in den ungewaschenen EK von Tag 1 bis 14 auf 361%, in den gewaschenen auf 313% des Ausgangswertes. Signifikant höher waren auch die extrazellulären Kaliumwerte der ungewaschenen EKs an Tag 28. Am Tag 42, bestanden keine signifikanten Unterschiede mehr. Diese Verlaufskurven entsprechen den Angaben in der Literatur (Rapoport 1947, Crawford 1955, Wallas 1979).

Die Tatsache, dass in vitro eine Ionenverteilung wie sie in vivo vorliegt, nicht aufrecht erhalten werden kann, hat mehrere Gründe:

1. Die Aktivität der membranständigen Na^+/K^+ -ATPase wird mit zunehmender Lagerungsdauer immer geringer, so dass der ständige Kaliumausstrom entlang des Konzentrationsgefälles nicht mehr ausreichend kompensiert werden kann. Die bei der Lagerung der EKs vorgeschriebene Temperatur von 4°C hemmt die Na^+/K^+ -ATPase zudem fast vollständig. Die Temperaturabhängigkeit der Na^+/K^+ -ATPase wurde von Wood and Beutler 1967 erstmals beschrieben, und unterstützt von den Ergebnissen von Wallas, der 1979 zeigte, dass der Kaliumefflux nur unwesentlich vom ATP-Gehalt selbst beeinflusst wird. Weiterhin zeigte Wallas (1979), dass die Hemmung des membranständigen Enzyms in Kälte reversibel ist und somit bei Temperaturerhöhung die ursprünglichen Konzentrationsverhältnisse wiederhergestellt werden können. Das bedeutet für die Praxis, dass nach Transfusion von gelagerten EK die intrazellulären Kaliumkonzentrationen innerhalb von einigen Tagen wieder physiologische Werte erreichen. Die

Natriumkonzentrationen hingegen normalisieren sich bereits nach 24 Stunden (Crawford et al 1955, Valeri et al 1969).

2. Als weiteren Grund für den Kaliumefflux muss die mechanische Schädigung der Erythrozyten während der Waschvorgänge in Erwägung gezogen werden (Högman et al 1981). Aufgrund der starken Zellschwellung und der steigenden Fragilität ist eine stärkere mechanische Schädigung bei den Waschprozessen denkbar.

In Versuchen von Beutler et al (1982) wurde gezeigt, dass in CPD-A gelagertem Blut die Erythrozyten an osmotischer Resistenz verloren. Es resultiert eine erhöhte Hämolyserate mit Freisetzung von Kalium und anderen intrazellulären Substanzen wie LDH.

3. Darüber hinaus kommt es in beiden Präparationen aufgrund verminderter Stoffwechselleistungen indirekt zu einem weiteren Kaliumefflux. Da die Reduktion von Glutathion durch Abnahme der ATP-Konzentration nur noch in geringem Umfang geschieht, wird der Erythrozyt nur ungenügend vor oxidativem Stress geschützt. Dies beeinträchtigt wiederum rückwirkend die Membranstabilität und Stoffwechselaktivität negativ.

4. Ein weiterer Faktor, der für den ansteigenden Kaliumefflux während der Lagerung verantwortlich sein könnte, sind die granulozytären Proteasen und oxidativ wirksame Metabolite. In Versuchen von Claster et al (1987) konnte gezeigt werden, dass durch Aktivierung von Granulozyten Proteasen, Lipasen und andere oxidativ wirksame Metabolite freigesetzt werden, die letztendlich zu einer Erythrozytenmembranschädigung führen. Dies wiederum bedingt einen verstärkten Kaliumausstrom. Da bei den gewaschenen EK der Granulozytenanteil geringer ist als bei den ungewaschenen Kontrollen, ist das Ausmaß der Membranschädigung auch geringer, was sich in den signifikant niedrigeren extrazellulären Kaliumwerten der gewaschenen Präparate zeigt. An Tag 1 und Tag 42 kommt dieser Mechanismus noch nicht oder nicht mehr zum Tragen.

Die Tatsache, dass der Kaliumausstrom in den ersten 14 Tagen am größten ist, liegt vermutlich darin begründet, dass der Konzentrationgradient für Kalium zwischen intra- und extrazellulär in

diesem Zeitraum am größten ist. Außerdem sind die Proteasen vermutlich zu Beginn am stärksten wirksam.

Die intrazellulären Kaliumkonzentrationen zeigen einen mehr oder weniger komplementären Verlauf zu den extrazellulären Werten.

5. Der Unterschied an Tag 1 ist wahrscheinlich auf das Waschen („Auswaschen“) zurückzuführen. Dadurch kommt es im Extrazellulärraum zu einer Verminderung der K^+ -Konzentration, die bei den Kontrollen nicht zum Tragen kommt.

Die intrazellulären Kaliumkonzentrationen zeigen einen mehr oder weniger komplementären Verlauf.

4.4.6 Natrium intra- und extrazellulär

Natrium liegt im Gegensatz zum Kalium im Extrazellulärraum in wesentlich höheren Konzentrationen vor als intrazellulär. Unter physiologischen Bedingungen beträgt die Natriumkonzentration intrazellulär 10 mmol/l, extrazellulär 135–145 mmol/l. Es kommt zu einer Diffusion der Natriumionen entlang des Konzentrationsgefälles von extra- nach intrazellulär. Gleichzeitig kommt es zu einem aktiven Transport von Natriumionen nach außen mit Hilfe der Na^+/K^+ -ATPase.

Die intrazelluläre Ausgangskonzentration von Natrium war bei gewaschenen und ungewaschenen EK-Präparationen nicht signifikant verschieden, ebenso verhielten sich die Konzentrationen an den Tagen 14, 28 und 42. Der intrazelluläre Konzentrationsanstieg in den beiden Präparationen verlief nahezu parallel. Der steilste Anstieg, 70% des Ausgangswertes, fand innerhalb der ersten 14 Tage statt, was darauf zurückzuführen ist, dass der Konzentrationsgradient zu Beginn am größten war. Der Natriumanstieg im Intrazellulärraum geht mit einem gleichzeitigen extrazellulären Natriumabfall einher. Allerdings ist in den Abbildungen 7 und 8 zu erkennen, dass der intrazelluläre Natriumanstieg scheinbar größer ist als der extrazelluläre

Natriumabfall. Es muss jedoch in diesem Zusammenhang offen bleiben, warum die Summe von intra- und extrazellulärem Natrium sich über die Lagerungszeit nicht konstant verhält (Summendaten sind nicht dargestellt). Die Natriumkonzentrationen extrazellulär blieben ab dem Tag 14 auf einem Plateau, es fanden in beiden EK-Aufbereitungen keine signifikanten Änderungen mehr statt.

4.4.7 Sauerstoffpartialdruck pO_2

Eine der wichtigsten Aufgaben der Erythrozyten ist die Versorgung des Gewebes mit ausreichend Sauerstoff. In den Erythrozyten übernimmt das Hämoglobin diese Aufgabe. Deshalb ist es wichtig, dass eine ausreichende Menge an funktionstüchtigem Hämoglobin zur Verfügung steht und die Bedingungen des umgebenden Milieus so beschaffen sind, dass auch die notwendige Menge an Sauerstoff an das Gewebe abgegeben werden kann. In der sogenannten Sauerstoffdissoziationskurve wird die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins erfaßt. In dieser Kurve wird auch der Einfluß von Temperatur, pH-Wert und die 2,3-DPG-Konzentration in den Erythrozyten ganz deutlich. Die Kurve zeigt einen sigmoidalen Verlauf. Temperaturerniedrigung, pH-Wert-Erhöhung und ein Absinken der 2,3-DPG-Konzentration erhöhen die Sauerstoffaffinität. Bereits in ACD-gelagerten Vollblutpräparaten zeigten sich nach längerer Lagerungsdauer eine signifikante Zunahme der O_2 -Affinität des Hämoglobins der Erythrozyten, die allerdings reversibel war (Ioppolo et al 1974). Von Chanutin (1967) wurde gezeigt, dass dieser Effekt auf die Kinetik des 2,3-DPG-Gehalts zurückzuführen ist.

Bei den durchgeführten Blutgasanalysen hat sich gezeigt, dass die O_2 -Partialdrücke beider EK-Aufbereitungen am ersten Meßtag nicht signifikant verschiedenen waren und mit 74 mmHg bei SAG-M und 66 mmHg bei den

ungewaschenen Kontrollen noch im Normbereich für venöses Blut lagen. Bereits nach 14 Tagen Lagerung stiegen die Werte vergleichbar und höchst signifikant an, gefolgt von einem Plateau in den darauffolgenden 14 Tagen. Dies lässt darauf schließen, dass beide EK-Präparationen schon nach einer Lagerungszeit von 14 Tagen vollständig mit Sauerstoff aufgesättigt waren. Offensichtlich führt die hohe Gaspermeabilität des Beutelmaterials zu der beschriebenen Kinetik der O₂-Partialdrücke.

4.4.8 Kohlendioxidpartialdruck pCO₂

Die ermittelten Kohlendioxidpartialdrücke zeigen in den beiden Erythrozytenkonzentrataufbereitungen gegensinnige Verläufe. Dabei erkennt man höchst signifikant unterschiedliche pCO₂-Anfangsdrücke der beiden Präparationen. In den mit SAG-M gewaschenen Präparationen liegen die Werte mit einem Mittelwert von 5.91 mmHg weit unter dem physiologischen Normalwert von 36–43 mmHg (Silbernagel 1991)

Im Gegensatz dazu liegt der Mittelwert der ungewaschenen Präparationen bei 53,2 mmHg und damit nur gering über dem Normalwert. Für die ermittelten Ergebnisse gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten.

Erstens ist möglicherweise durch die Waschvorgänge ein Großteil des in der Erythrozytensuspension gelösten CO₂ entfernt worden. Dabei hat sich nach jedem Waschvorgang ein neues Gleichgewicht zwischen gelöstem und ungelöstem CO₂ eingestellt, so dass beim darauffolgenden Waschen wieder gelöstes CO₂ entfernt werden konnte. Bei den Kontrollen entfällt dieser Auswascheffekt.

Zweitens ist denkbar, dass in den ungewaschenen EK der Glukoseabbau vermehrt über den oxidativen Pentosephosphatweg abläuft und dadurch vermehrt CO₂ entsteht (Högman et al 1986), was die dargestellten Ergebnisse der CO₂-Partialdrücke unterstützt.

Die Tatsache, dass sich im weiteren Verlauf die Kurven sehr unterschiedlich verhalten, das heißt, dass CO_2 in den Kontrollen abfällt und in den GEW ansteigt, hat möglicherweise mit der unterschiedlichen Gaspermeabilität und den Druckgradienten zu tun. In den Kontrollen ist die CO_2 -Konzentration deutlich höher als in den gewaschenen Präparaten (Auswascheffekt), was eine vermehrte Abgabe von CO_2 entlang des Konzentrationsgefälles in den Kontrollen erklären würde. Das während der Lagerung langsame und stetige Ansteigen des pCO_2 in den gewaschenen EK ist in erster Linie mit dem oben angeführten Glucoseabbauweg zu erklären. An Meßtag 28 haben sich die Kohlendioxidpartialdrücke beider Präparationen angenähert, sind allerdings noch signifikant unterschiedlich. Man würde erwarten, dass sich nach weiteren 14 bzw. 28 Tagen Lagerung die Werte für pCO_2 noch weiter annähern, da es zu einem sogenannten steady state zwischen Innen- und Außenmilieu kommen sollte.

4.4.9 Beutelmateriale und -beschaffenheit

Die heute verwendeten Plastikbeutel zur Aufbewahrung von Blutbestandteilen ermöglichen eine sterile Verarbeitung und haben bessere Eigenschaften bezüglich Gasaustausch und Biokompatibilität (Beutler et al 1972, Sasakawa et al 1976).

Vom verwendeten Beutelmateriale hängt die Durchlässigkeit der Gase Kohlendioxid und Sauerstoff ab. Vor allem die Durchlässigkeit für Kohlendioxid spielt eine entscheidende Rolle, da die CO_2 -Abgabe der Erythrozyten den pH-Wert stabilisiert. Der pH-Wert wiederum ist von entscheidender Bedeutung bei der Neusynthese von ATP (Mazor et al 1994).

Nicht nur Gasdurchlässigkeit des Beutelmateriale, sondern auch der verwendete Weichmacher DEHP per se, beeinflussen den erythrozytären Stoffwechsel. In zahlreichen Untersuchungen wurde festgestellt, dass der Weichmacher DEHP sich aus dem Plastikbeutel herauslöst und in den

Beutelinhalt und in die darin enthaltenen Zellen diffundiert (Rock et al 1984). Ein Teil des Weichmachers geht Verbindungen mit der Zellmembran ein, was zur Stabilisierung der Membran führt (Au Buchon et al 1988). Ein weiterer Teil ist im Lipidanteil des Plasmas gelöst (Sasakawa et al 1978, Rock et al 1984). Die Menge ist abhängig von Lagerungsdauer, Lagerungstemperatur und Lipidgehalt der Lösung (Jaeger et al 1972). Ein in zahlreichen Untersuchungen belegter, wichtiger Effekt des Weichmachers ist der, dass dadurch die Hämolyserate und die Mikrovesikulation verringert werden können (Muylle et al 1994) Die derart gelagerten Erythrozyten wiesen eine bessere Konservierung im Sinne einer verbesserten osmotischen Resistenz auf und zeigten einen besseren Morphologie-Score (Au Buchon et al 1988; Greenwalt et al 1991).

Neben den positiven Eigenschaften der Weichmachers muss jedoch erwähnt werden, dass diese Substanzen von manchen Autoren als mehr oder weniger toxisch eingestuft sind (Rubin et al 1989).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Bisher waren Erythrozytenkonzentrate (EK) nach dem Waschen in physiologischer Kochsalzlösung nur maximal 24 Stunden für eine Transfusion geeignet. Durch das Waschen kam es zu einer Unterbrechung des geschlossenen Systems und zur Depletion der Additivlösung, wodurch die Haltbarkeit dieser Präparate auf maximal 24 Stunden begrenzt wurde. Ziel dieser Arbeit, in der die biochemischen und rheologischen Eigenschaften von ungewaschenen und gewaschenen EK verglichen wurden, war es eine alternative Wasch- und Lagerungsmethode zu evaluieren.

Nach Komponentenseparation wurden dazu 16 frische in SAG-M-Lösung suspendierte EK von gesunden Spendern unter Verwendung eines Sterilschlauchsweißgerätes portioniert. Eine Hälfte wurde zweimal mit je 200 ml SAG-M-Lösung gewaschen und dann in SAG-M resuspendiert. Die andere Hälfte blieb unbehandelt und wurde als Kontrolle mitgeführt.

An den Tagen 1, 14 und 28 (teilweise 42) nach dem Waschprozess wurden zur Beurteilung der Lagerungsfähigkeit die biochemischen Parameter ATP und DPG, als Maß für die Sauerstoffabgabefähigkeit, sowie Blutgase, Elektrolyte und Hämolyseparameter untersucht. Außerdem wurden die EK auf Sterilität geprüft.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass gewaschene EK, die unter Verwendung des SCD-312-Steril-Schlauchsweißgerätes (Du Pont, Newtown) hergestellt werden, den Qualitätsanforderungen hinsichtlich der Sterilität entsprechen. Im Hinblick auf die untersuchten biochemischen und rheologischen Parameter sind die mit SAG-M gewaschenen und darin aufgeschwemmten EK mindestens 14 Tage haltbar.

6 Literaturverzeichnis

Albrecht V, Roigas H, Schultze M, Jacobasch G, Rapoport S
The influence of pH and methylene blue on the pathways of glucose utilization
and lactate formation in erythrocytes of man
Eur J Biochem 1971; 20:44–50

Allan D, Billah MM, Finean JB et al
Release of diacylglycerol-enriched vesicles from erythrocytes with
increased intracellular Ca
Nature, 1976; 261:58–60

AuBuchon JP, Estep TN, Davey RJ
The effect of the plasticizer di-2-ethylhexyl phthalate on the survival of stored
RBCs.
Blood 1988; 71: 448–52

Benedum J
Die Entwicklung der Bluttransfusion. In: Mueller-Eckardt C (Hrsg.)
Transfusionsmedizin,
2. Aufl.; Springer, Berlin, 1988: 3–18

Benesch R, Benesch RE
The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric
properties of hemoglobin
Biochem Biophys Res Commun 1967; 26: 162–167

Bernstein RE

Alterations in metabolic energetics and cation transport during ageing of red cells

J Clin Invest 1959; 38: 1572–1586

Beutler E

The red cell metabolism.

in: Red cell metabolism, New York, Grune et Stratton, 1975

Beutler E, Duron O

The preservation of red cell ATP: The effect of phosphate

Transfusion 1966; 6: 124–129

Beutler E, Kuhl W, West C

The osmotic fragility of erythrocytes after prolonged liquid storage and after reinfusion.

Blood 1982; 59: 1141–1147

Beutler E, Meul A, Wood LA

Depletion and regeneration of 2,3-diphosphoglyceric acid in stored red blood cells

Transfusion 1969; 9: 109–114

Beutler E, West C

Storage of red cell concentrates in CPD-A2 for 42 and 49 days

J Lab Clin. Med 1983; 102: 53–62

Beutler E, West C

The storage of hard packed red blood cells in citrate-phosphate-dextrose (CPD) and CPD-adenine (CPDA-1).

Blood 1979; 54:280–4

Beutler E, Wood L

Preservation of red cell 2,3-DPG and viability in bicarbonate containing medium: The effect of blood bag permeability

J Lab Clin Med 1972; 80: 723–728

Beutler E, Wood L

The in vivo regeneration of red cell 2,3- diphosphoglycerate acid (DPG) after transfusion of stored blood

J Lab Clin Med 1969; 74: 300–304

Bordin JO, Bardossy L, Blajchman MA

Experimental animal model of refractoriness to donor platelets: the effect of plasma removal and the extent of white cell reduction on allogenic alloimmunization

Transfusion 1993; 33: 798–801

Brecher ME, Taswell HF

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the transfusion of washed red cells.

Transfusion 1989; 29: 681–685

Brugnara C, Tostesto DC

Cell volume, K transport and cell density in human erythrocytes

Am J Physiol 1987; 252: 269–276

Bux J

Herstellung von Blutkomponenten

Mueller-Eckhardt C (Hrsg.), Transfusionsmedizin, Springer, Berlin, 1996: 242

Card RT, Mohandas H

Deformibility of Stored red blood cells; Relationship to degree of packing

Transfusion 1982; 22: 96-101

Chanutin A, Curnish RR

Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes

Arch Biochem Biophys 1967; 121: 96–102

Chanutin A

The effect of the addition of adenine and nucleosides at the beginning of storage on the concentrations of phosphates of human erythrocytes during storage in acid–citrate–dextrose and citrate-phosphate–dextrose.

Transfusion 1967; 7: 120–132

Claster S, Quintanilha A, Schott MA, Chiu D, Lubin B

Neutrophil-induced K⁺-leak in human red cells: A potential mechanism for infection mediated hemolysis

J Lab Clin Med 1987; 109: 201–210

Cleland WW

Determining the chemical mechanisms of enzyme-catalysed reactions by kinetic studies

Adv Enzymol 1977; 45: 273–287

Council of Europe Press

Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components; 1992

Crawford H, Mollison PL

Reversal of electrolyte changes in stored red cells after Transfusion

J Physiol 1955; 129: 639–647

Delivoria-Papadopoulos M; Morrow G; Oski FA

Exchange Transfusion in the newborn infant with fresh and „old“ Blood: the role of storage on 2,3-diphosphoglycerate, hemoglobin-oxygen affinity, and oxygen release

J Pediatric 1971; 79: 898–903

Dennis RC, Vito L, Wiesel RD, Valeri CR, Berger RC, Hechtman HB

Improved myocardial performance following high 2,3-diphosphoglycerate red cell transfusion

Surgery 1975; 77: 741–747

Dern RJ, Brewer GJ, Wiorkowski JJ

Studies on the preservation of human blood. II. The relationship of erythrocyte adenosine triphosphate levels and other in vitro measures to red cell storageability

J Lab Clin Med 1967; 69: 968–978

Dern RJ, Wiorkowski JJ, Matsuda T

Studies of the preservation of human blood. The effect of mixing anticoagulated blood during storage on the post-storage erythrocyte survival

J Lab Clin Med 1970; 75: 37–42

Deutsches Arzneibuch

10. Auflage mit 3. Nachtrag, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 1994

De Verdier CH, Garby L, Hjelm M, Astrup P, Rorth M

The erythrocyte as a vehicle for oxygen with self-regulating adjustment of unloading

Scand J Clin Lab Invest 1970; 26:193–198

Duhm J

Effects of 2,3-diphosphoglycerate and other organic phosphate compounds on oxygen affinity and intracellular pH of human erythrocytes

Pflügers Arch 1971; 326: 341–356

Düsing R

Säure-Basenhaushalt

Siegenthaler W (Hrsg.), Klinische Pathophysiologie, Thieme, Stuttgart-New York, 1994

Eckstein R

Immunhämatologie und Transfusionsmedizin

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1993

Ericson A, Verdier CH

A modified method for the determination of 2,3-diphosphoglycerate in erythrocytes

Scand J Clin Lab Invest 1972; 29: 84–90

Feo C, Mohandas N

Clarification of role of ATP in red-cell morphology and function

Nature 1977; 265: 166–168

Funder J, Wied JO

Potassium, sodium and water in normal human red cells

Scand J Clin Lab Invest 1964; 18: 167–180

Gareau R, Brisson GR, Goulet H et al

Blood banking-induced senescent modifications on red blood cells

Cell Mol Biol 1992; 38: 395–398

Greenwalt TJ, McGuinness CG, Dumaswala UJ.

Studies in red blood cell preservation.4. Plasma vesicle hemoglobin exceeds free hemoglobin

Vox Sang 1991; 61: 14–17

Grossmann R, Mansouri T, Geise W, Langer, Henrich HA, Wiebecke D

Gewaschene Erythrozytenkonzentrate, hergestellt unter Einsatz von SAG-M als Wasch- und Resuspensionslösung, und ihre Qualitätsbeurteilung anhand rheologischer Parameter

Infusionsther Transfusionsmed 1998; 25: 254–259

Guppy M, Attwood PV, Hansen IA, Sabaratnam R, Frisina J, Maxwell EW

PH, temperature and lactate production in human red blood cells: Implications for blood storage and glycolytic control

Vox Sang 1992; 62: 70–75

Haradin AR, Wee RI, Reed CF

Changes in physical properties of stored erythrocytes. Relationship to survival in vivo

Transfusion 1969; 9: 229–237

Högman CF, Arro E, Hedlund K

Red cell preservation in protein-poor media 2. Studies of changes in red cell shape during storage.

Haematologia 1980;13: 135–144

Högman CF, Hedlund K, Akerblom O, et al.

Red blood cell preservation in protein-poor media. Leukocyte enzymes as a cause of hemolysis

Transfusion 1978; 18: 233–241

Högman CF, Hedlund K, Sahlestrom Y.

Red cell preservation in protein-poor media. III. Protection against in vitro hemolysis

Vox Sang 1981; 41: 274–281

Högman CF

Blood preservation considering the possibilities, the patient and the purse.

Acta Biol Med Ger 1981; 40: 717–720

Högman CF, de Verdier CH, Ericson A, Hedlund K, Sandhagen B

Effects of oxygen on red cells during liquid storage at +4 degrees C

Vox Sang 1986; 51:27–34

Högman CF, Eriksson L, Hedlund K, Wallvik J

The bottom and top system: A new Technique for blood component preparation and storage

Vox Sang 1988; 55: 211–217

Högman CF, Eriksson L, Ring M.

Automated blood component preparation with the Opti system: three years' experience

Beitr Infusionsther 1992; 30:100–107

Högman CF.

Preparation and preservation of red cells.

Vox Sang 1998; 74: 177–187

Illert W

Erythrozytenhaltige Arzneimittel - Qualität und Haltbarkeit

Krankenhauspharmazie 1994; 15: 510–516

International Committee for Standardization in Hematology of the European Society of Hematology: Recommendations and Requirements for Hemoglobin in human blood

J Clin Path 1965; 18: 353

Ioppolo C, Amiconi G, Currell DL, Maffei G, Zolla L, Antonini E
Biochemical changes on storage of blood. Decrease in rate of methemoglobin reduction and increase in oxygen affinity on storage of ACD blood

Vox Sang 1974; 27: 403–10

Jaeger RJ, Rubin RJ

Migration of phthalate ester plasticizer from polyvinylchloride blood bags into stored human blood and its localization in human tissues

N Engl J Med 1972; 287: 1114–1118

Jaworek D, Gruber W, Bergmayer HU

Adenosin-5'- Phosphat- Bestimmung mit 3- Phosphoglycerat- Kinease, in:

Bergmayer HU (Hrsg.), Methoden der enzymatischen Analyse

3. Aufl, Verlag Chemie, Weinheim, 1974: 2174–2151

Kaiser M, Scholz M, Strauss D

Qualitätsbewertungs von gewaschenen und buffy-coat-freien

Erythrozytenkonzentraten

Folia Haematologica 1990; 117: 79–88

Karger M, Kretschmer V

Qualität von Vollblut und Erythrozytenkonzentraten

Eine Literaturanalyse; Hämatologie 1996; 5: 78–88

Kay MMB, Marchalonis JJ, Schluter SF, Bosnan G
Human erythrocyte aging: cellular and molecular biology
Transf Med Rev 1991; 5: 173–195

Kluwe WW, Hasemann JK, Huff JE
The carcinogenicity of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in perspective
J Toxicol Environ Health 1983; 12: 159–169

Labow RS, Card RT, Rock G
The effect of the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate on red cell deformability
Blood 1987; 70: 319–323

La Celle PL
Alteration of deformability of the erythrocyte membrane in stored blood
Transfusion 1969; 9: 238–245

La Celle PL, Kirchpatrick H, Utkow MD et al
Membrane fragmentation Ca-membrane interaction: potential mechanism of
shape in the senescent red cell
in Bessis M, Weed RJ, Leblond PF (Hrsg.)
Red cell shape. Springer, New York, 1973,

Lachant NA, Noble NA, Myrhe BA, Tanaka KR
Antioxidant metabolism during blood storage and its relationship to
posttransfusion red cell survival
Am J Hematol 1984; 17: 237–249

Lee P, Kirk G, Hoffman JF
Interrelations among Na and K content, cell volume, and buoyant density in
human red cell populations
J Membrane Biol 1984; 79: 119–126

Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten
Hrsg.: Vorstand und wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer, Köln,
Deutscher Ärzteverlag GmbH, 1995.

Leterrier F, Saint-Blancard J, Stolz JF
Biophysical, morphological and rheological modifications of the erythrocyte
during storage: A review
Clinical Hemorheology 1993; 3: 53–95

Lutz HU
Vesicles isolated from ATP-depleted erythrocytes and out of thrombocyte-rich
plasma
J Supramol Struct 1978; 8: 375–389

Manojkumar V, Deepadevi KV, Arun P, Nair KG, Lakshmi LR, Kurup PA
Changes in the composition of erythrocyte membrane during storage of blood
in di-(2-ethyl hexyl) phthalate [DEHP] plasticized poly vinyl chloride (PVC)
blood storage bags
Indian J Med Res 1999; 109: 157–163

Mansouri Taleghani B, Langer R, Grossmann R, Opitz A, Habs Guth U,
Buchheister A, Schuler S, Bachthaler R, Wiebecke D
Verbesserung der biochemischen und rheologischen Qualität von Vollblut und
Erythrozytenkonzentraten durch Leukozytendepletion vor Lagerung
Anaesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 2001; 36: 11–19

Matthes G, Weber F, Bartel U, Manitz L, Leuschner M, Roigas H
Studies on the storage of erythrocytes in various blood stabilizers at 25
degrees C
Z Gesamte Inn Med 1972; 27: 594–601

Matthes G, Richter E, Tofoé U, Kucera W, Lerche D
Metabolische und rheologische Veränderungen bei der hypothermen
Langzeitlagerung von Erythrozytenkonzentraten über 15 Wochen
Beitr Infusionsther Transfusionsmed, 1994; 32: 34–40

Matthes G, Strunk S, Siems W, Grune T
Postransfusial Changes of 2,3-diphosphoglycerate and nucleotides in CPD-
SAGM-preserved erythrocytes
Infusionsther Transfusionsmed 1993; 20: 89–92

Matthes G, Strunk S, Storek W, Strauss D
P31- NMR- Untersuchungen zur In- vivo- Regeneration konservierungs-
bedingter Veränderungen des 2,3- Diphosphoglyceratgehalts roter Blutzellen
Beitr Infusionsther 1990; 26: 76–80

Mavrina L et al, Untersuchung zur Verbesserung der Lagerfähigkeit von
Blutkonserven durch Einsatz von bicompatiblen Adsorbentien; Beitr.
Transfusionsmed.Basel, Karger, 1994; 32: 41–43

Mazor D, Dvilansky A, Meyerstein N
Prolonged storage of red cells: The effect of pH, adenine and phosphate
Vox Sang 1994; 66: 264-269

Meryman HT, Bross J, Lebovitz R
The preparation of leukocyte- poor red blood cells: a comparative study
Transfusion 1980; 20: 28–92

Meryman HT, Hornblower ML
Manipulating red cell intra- and extracellular pH by washing
Vox Sang 1991; 60: 98–104

Meryman HT, Hornblower ML, Syring RL, Mesbah- Karimi N

Extending the storage of red cells at 4°C

Transfus Sci 1994; 15: 10–15

Merymen HAT, Hornblower M, Keegan T, Syring R, Heaton A, Mesbah- Karimi N, Bross J

Refrigerated storage of washed red cells

Vox Sang 1991; 60: 88–98

Michael JM, Dorner I, Bruns JH, et al

Potassium load in CPD-Preserved Whole Blood and Two Types of Packed Red Blood Cells

Transfusion Mar.-Apr. 1975, Volume 15, Number 2

Mills GC, Schmalstieg, Trimmer B, Goldman AS, Goldblum RM

Purine metabolism in adenosine deaminase deficiency

Proc Natl Acad Sci USA 1976; 73: 2867–2871

Minakami S, Tomoda A, Tsuda S

Effect of intracellular pH (pHi) change on red cell glycolysis, in: Brewer GJ (Hrsg.), Erythrocyte structure and function

Liss. New York, 1975: 149–166

Minakami S, Yoshikawa H

Inorganic phosphate and erythrocyte glycolysis

Biochem Biophys Acta 1965; 99: 175–178

Minakami S, Yoshikawa H

Studies on erythrocyte glycolysis

J Biochem 1966; 59: 145–150

Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M
Blood transfusion in clinical medicine
Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1993

Mueller-Eckardt C
Transfusionsmedizin
2. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1988

Mueller-Eckardt C
Transfusionsmedizin, Grundlagen, Therapie, Methodik
2. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1996

Müller- Plathe O, Spichinger- Keller UE, Lammers M
Wasser- und Elektrolytstoffwechsel, in: Greiling H, Gressner M (Hrsg.),
Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie
3. Aufl, Schattauer, Stuttgart 1955; 470–499

Muyllé L, Vanderplanken M, Stewart M, Payrat JM
Storage of saline- adenine- glucose- mannitol suspended red cells in
diethylhexyl phthalate and butyryl- n- trihexyl- citrate plasticized polyvenyl
chloride containers. An in vitro comparative study
Transfus Sci 1994; 15: 163–169

Myhre BA, Marcus CS
The extension of 4°C storage time of frozen- thawed red cells
Transfusion 1992; 32: 344–348

Nakao T, Nagai F, Nakao M.

Posttransfusion viability of rabbit erythrocytes preserved in a medium containing inosine, adenine, and isoosmotic sucrose

Vox Sang 1982; 42: 217–22

Petrides PE

Blut, in Löffler G u. Petrides PE (Hrsg.), Physiologische Chemie

4. Aufl., Springer, Berlin, 1990

Prins HK, de Bryn JCGH, Heinrichs HPJ, et al

Prevention of microaggregate formation by removal of "buffy coat",

Vox Sanguinis 1980; 39: 48–51;

Radcliffe JH, Denham MA, Gaydos C, Simpson MB Jr.

Bacteriological sterility of washed deglycerolized red blood cells after 72 hours storage

Transfusion 1978; 18: 365–366

Raftos JE, Chapman BE, Kuchel PW, Lovric VA, Stewart IM

Intra- and extraerythrocyte pH at 37°C and during long- term storage at 4°C: 31P NMR measurements and an electrochemical model of the system

Haematologia 1986; 19: 251–268

Rapoport SM

Synthese und Abbau des ATP

in: Medizinische Biochemie, Rapoport SM (Hrsg.)

7. Aufl., VEB, Berlin, 1977

Rapoport SM

Dimensional, osmotic and chemical changes of erythrocytes in stored blood. I. blood stored in sodium citrate, neutral, and acid citrate- glucose (ACD) mixtures

J Clin Invest 1947; 26: 591–15

Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion (Hämotherapie)

Bundesgesundheitsblatt, 1996;12: 468–488

Rock G, Tocchi M, Ganz PR, Tackaberry ES

Incorporation of plasticizer into red cells during storage

Transfusion 1984; 24: 493–498

Roelke D

Unerwünschte Wirkungen von Blutübertragungen, in: Müller- Eckhardt C (Hrsg.), Transfusionsmedizin

2. Aufl., Springer, Berlin, 1988: 540–542

Rossi EC, Simon TL, Moss GS, Gould SA

Principles of Transfusion Medicine

2.Aufl. Williams & Wilkins, Philadelphia, 1995: 13–19

Roth M

Herstellung gewaschener Erythrozytenkonzentrate mittels eines neuen Verfahrens und ihre Qualitätsbeurteilung anhand mehrerer biochemischer Parameter

Med. Dissertation, Würzburg, 1999

Rubin RJ, Ness PM

What price progress? An update on vinyl plastic blood bags

Transfusion 1989; 29: 358–361

Rumsby MG, Trotter J, Allan D

Recovery of membrane microvesicles from human erythrocytes stored for transfusion: a mechanism for the erythrocyte- to- spherocyte- transformation
Biochem Soc Transact 1977; 3: 126–128

Sanner HE, Wooten MJ

Analysis of saline-washed red cells for transfusion to neonatal patients
Transfusion 1985; 25: 437–438.

Sasakawa S, Mitomi Y

Die- 2- ethylhexylphthalate (DEHP) content of blood or blood components stored in plastic bags
Vox Sang 1978; 34: 81–88

Sasakawa S, Tokunaga E

Physical and chemical changes of ACD- preserved blood: A comparison of blood in glas bottles and plastic bags
Vox Sang 1976; 31: 199–210

Schuster R, Holzhutter HG, Jacobasch G

Interrelations between glycolysis and the hexose monophosphate shunt in erythrocytes as studied on the basis of a mathematical model
Biosystems 1988; 22: 19–36

Silbernagel S, Despopoulos A

Säure-Basen-Haushalt

Taschenatlas der Physiologie, 4.Aufl. Thieme, Stuttgart/New York, 1991

Simon ER

Adenine in Blood Banking

Transfusion 1977; 17: 317–325

Strauss D, Lucke H, Lucke T

Zellform von Erythrozyten während der Konservierung mit Adenin und Nucleosiden

Folia haemat; 1978 105: 269–276

Strauss D, Richter H, Fünfhausen G

Analysis of the shelf life and transfusion life of whole blood and erythrocyte concentrates

Folia Haematol Int Mag Klein Morph Blutforsch 1986; 113: 550–559

Strauss D, Starcck E, Seidl B

Gewaschenes Erythrozytenkonzentrat, Reinheitsgrad und Zellvitalität

Z Ges Inn Med 1981; 36: 443–447

Stryer L

Biochemie

3. Aufl., Spektrum Akad Verlag, 1991: 185–271

Thews G

Atemgastransport und Säure- Basen Status des Blutes

in: Schnidt RF, Thews G (Hrsg.), Physiologie des Menschen

23. Aufl, Springer, Berlin, 1987; 611–632

Toellner R

Illustrierte Geschichte der Medizin

Band V.

Tomada A, Tsuda- Hirota S, Minakami S

Glycolysis of red cells suspended in solutions of impermeable solutes

J Biochem 1977; 81: 697–701

Tozzi-Ciancarelli MG, Di Massimo C, Mascioli A

Aging of human erythrocytes: the role of membrane perturbations induced by in vitro ATP-depletion

Cell Mol Biol 1992; 38: 303–310

Tsuboi KK, Fukunaga K

Inorganic phosphate and enhanced glucose degradation by the intact erythrocyte

J Biol Chem 1965; 240: 2806–2810

Tsuda S, Tomoda A, Minakami S

Intracellular pH (pHi) of red cells stored in an acid citrate dextrose medium.

Effect of temperature and citrate anions

J Biochem 1975; 78: 469–474

Valeri CR, Hirsch NM

Restoration in vivo of erythrocyte adenosine triphosphate,

2,3-diphosphoglycerate, potassium ion, and sodium ion concentrations

following the transfusion of acid-citrate-dextrose-stored human red blood cells

J Lab Clin Med 1969; 73: 722–733

Valeri CR, Szymanski IO, Zaroulis CG

24-hour survival of ACD- and CPD- stored red cells. 1. Evaluation of

nonwashed and washed stored red cells

Vox Sang 1972; 22: 289–308

Von Eisenhart-Rothe B, Ganschow I, Kühnl P

Vergleich der erythrozytären Konzentration von ATP,ADP,AMP und 2,3-DPG bei Lagerung in fünf verschiedenen additiven Lösungen und im Serum

Beitr Infusionstherapie 1992; 30: 131–135

Vorstand und Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer
Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten
Deutscher Ärzteverlag, Köln, 1995: 12

Wagner GM, Chiu DT, Yee MC, Lubin BH
Red cell vesiculation- a common membrane physiologic event
J Lab Clin Med 1986; 108: 315–324

Walker RH (Hrsg.)
Technical Manual
12. Aufl., American Association of Blood Banks, Bethesda 1996

Wallas CH
Sodium and potassium changes in blood bank stored human erythrocytes
Transfusion 1979; 19: 210–215

Weed RI, La Celle PL
ATP dependence of erythrocyte membrane deformability. Relation to „in vivo“
survival and blood storage, in: Jamieson GA, Greenwalt TJ (Hrsg.), The Red
Cell Membrane: Structure and Function
Lippincott, Philadelphia, 1969: 318–338

Weed RI, La Celle PL, Merrill EW
Metabolic dependence of red cell deformability
J Clin Invest 1969; 48: 795–905

Wissenschaftliche Tabellen Geigy
Teilband Hämatologie und Humangenetik
8. Aufl., Cyba- Geigy, Basel, 1979

Wolfe LC

Oxidative injuries to the red cell membrane during conventional blood preservation

Semin Hematol 1989; 26: 307–312

Wood L, Beutler E

Temperature dependence of sodium- potassium activated erythrocyte adenosine triphosphatase

J Lab Clin Med 1967; 70: 287–294

Wood L, Beutler E

The viability of human blood stored in,phosphate adenine media

Transfusion 1967; 7: 401–408

Wood LA, Beutler E

The effect of periodic mixing on the preservation of 2,3- diphosphoglycerate (2,3- DPG) levels in stored blood

Blood 1973; 42: 17–25

Zeile G et al.

Kompendium der praktischen Hämatologie

2. Auflage, GIT-Verlag, Darmstadt 1983

Zuck TF, Bensinger TA

Implications of sterile docking devices

Transfusion 1975; 15: 399–401

7 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abb. 1	Dreifach-U-Beutelsystem	05
Abb. 2	ATP-Synthese im Erythrozyten	10
Abb. 3	ATP- Konzentration während der Lagerung	22
Abb. 4	50%-ige Hämolyserate während der Lagerung	23
Abb. 5	2,3-DPG-Konzentration in mmol/l während der Lagerungsdauer von 28 Tagen	25
Abb. 6	Extrazellulärer pH-Wert während der Lagerung von 28 Tagen	26
Abb. 7	Intrazelluläre Natriumkonzentration (mmol/l) während einer Lagerungsdauer von 42 Tagen.	27
Abb. 8	Extrazelluläre Natriumkonzentration während einer Lagerungsdauer von 42 Tagen.	29
Abb. 9	Intrazelluläre Kaliumkonzentration von EK und Kontroll-EK während einer Lagerungsdauer von 42 Tagen.	30
Abb. 10	Extrazelluläre Kaliumkonzentration (mmol/l) während einer Lagerungsdauer von 42 Tagen.	31
Abb. 11	Kohlendioxidpartialdruck (pCO ₂) während einer Lagerungsdauer von 28 Tagen.	33
Abb. 12	Sauerstoffpartialdruck (pO ₂) während der Lagerung von gewaschenen und ungewaschenen EK.	35
Tab. 1	Verwendete Stabilisator- bzw. Additivlösung	07

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2,3-DPG	2,3-Diphosphoglycerat
ACD	Acid-Citrat-Dextrose
ADP	Adenosindiphosphat
AIHA	autoimmunhämolytische Anämie
ATP	Adenosintriphosphat
CALL	Critical Antigenic Leukocyte Load
CIILL	Critical Immunologic Leukocyte Load
CPD	Citrat-Phosphat-Dextrose
DEHP	Diethylphtalat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Erythrozytenkonzentrat
GAPD	Glycerinaldehyd-3-
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDH	Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase
HK	Hämatokrit
HR	Hämolyserate
NAD	Nicotinaminadenindinucleotid
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NADPH	Nicotinaminadenindinucleotidphosphathydrid
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PG	Phosphoglycerat
PGA	Phosphoglycerat gepuffert
PGK	Phosphoglycerat-Kinase
PGM	Phosphoglycerat-Mutase
Pi	anorganisches Phosphat
PNH	paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
SAGM	Saline-Adenine-Glucose-Mannitol
TGA	Trichloressigsäure
TIM	Triosephosphatisomerase

Danksagung:

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. D. Wiebecke für die Möglichkeit an der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie wissenschaftlich arbeiten zu dürfen, sowie die Erstellung des Referates.

Mein Dank gilt ebenso Frau Professor Dr. med. H. Rückle-Lanz für die Übernahme des Korreferates.

Mein besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. med. B. Mansourie-Thalegani, der sehr geduldig meine Arbeit verfolgt hat und mich zu jeder Zeit mit wertvollen Tipps und aufbauenden Worten unterstützt hat. Eine derartige Betreuung wünsche ich allen meinen Nachfolgern.

Mein Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. med. H. A. Henrich, Herrn Dr. rer. nat. R. Langer, sowie Frau S. Eber für die zur Verfügung gestellten Laborräume und Messgeräte und die gute Einweisung.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. med. F. Keller für die Analysen im Zentrallabor, sowie bei Herrn Prof. Dr. med. J. Heesemann für die mikrobiologischen Untersuchungen.

Ein besonderer Dank geht auch an Herrn Dr. med. R. Grossmann für die Geduld und gute Zusammenarbeit während der experimentellen Phase.

Für das Korrekturlesen der Arbeit und die kritischen Anmerkungen möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. med. R. Albrecht bedanken.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Transfusionsmedizin und experimentellen Chirurgie die in irgendeiner Form mit ihrer Arbeit unterstützend beigetragen haben, möchte ich ebenfalls danken.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mir jederzeit hilfreich zur Seite standen.

Curriculum Vitae

Gabriele Maria Waltenberger
Am Hag 12
83703 Gmund
geboren am 3. September 1964
in Schlierstadt

Ausbildung

09/1975 – 05/1984	Allgemeine Hochschulreife Burkhard-Gymnasium Buchen
11/1985 – 11/1987	Medizinisch technische Assistentin Berufsfachschule, Würzburg
05/1991 – 12/1997	Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
03/1993	Ärztliche Vorprüfung
07/1994	1. Staatsexamen
09/1996	2. Staatsexamen
12/1997	3. Staatsexamen
03/2000	Approbation:

Berufliche Tätigkeit

12/1987 – 09/1988	Mikrobiologisches Labor Prof. Dr. G. Enders, Stuttgart
10/1988 – 04/1991	Zentrallabor KKH, Buchen
02/2000	Arzt im Praktikum in der Kinderklinik Regensburg
03/2000 – 09/2000	Hospitation Anästhesie Kreis Krankenhaus Miesbach
07/2000 – 12/2000	Projektmanagement Expertensystem Anästhesie, Medizert Holzkirchen
Seit 01/2001	Wissensmanagement der Onkologie, Oncology World München

Würzburg, Juli 2002

