

Aus der Abteilung für Infektiologie, Tropenmedizin und Nephrologie  
der Universitätsmedizin Rostock,  
Direktor: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

# Lagerung von aus Buffy Coats gewonnenen Leukozytenkonzentraten über 72 Stunden

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin  
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von Susanne Reichert geb. Wolf

aus Tübingen

geboren am 16. September 1985 in Dresden

Rostock, Juni 2016

Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

1. Gutachter:

Prof. Dr. med. Steffen Mitzner

Klinik für Innere Medizin II, Sektion Nephrologie, Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. med. Volker Kiefel

Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter:

Prof. Dr. med. Barbara M. Bröker

Abteilung für Immunologie, Universitätsmedizin Greifswald

**Datum der Einreichung:** 27. Juni 2016

**Datum der Verteidigung:** 27. September 2017

# Inhaltsverzeichnis

## I. Abbildungsverzeichnis

## V. Tabellenverzeichnis

## VI. Abkürzungen

1. <u>Einleitung</u> .....	1
1.1 Leukozyten.....	1
1.2 Sepsis.....	4
1.3 Transfusion von Blutbestandteilen.....	9
1.4 Gewinnung von Granulozyten.....	11
1.5 Das extrakorporale Immununterstützungsverfahren EISS.....	12
2. <u>Zielsetzung</u> .....	14
3. <u>Material und Methoden</u> .....	15
3.1 Geräte.....	15
3.2 Materialien.....	16
3.3 Methoden.....	17
3.3.1 Aufreinigung der Buffy Coats.....	17
3.3.2 Lagerung.....	19
3.3.3 Bestimmung der Zellzahl.....	21
3.3.4 Vitalitätsbestimmung.....	21
3.3.5 pH-Wert.....	22
3.3.6 Chemilumineszenz.....	22
3.3.7 Bestimmung von Phagozytose und Oxyburst im Durchflusszytometer.....	23
3.3.8 Bestimmung von Glucose, Lactat und LDH.....	26
3.3.9 Elektronenmikroskopie.....	26
3.3.10 Statistik.....	26
4. <u>Ergebnisse</u> .....	27
4.1 Aufreinigung der Buffy Coats.....	27

4.2 Entwicklung der Zellzahl über 72 Stunden.....	30
4.3 Vitalität über 72 Stunden.....	33
4.4 pH-Wert über 72 Stunden.....	36
4.5 Chemilumineszenz über 72 Stunden.....	39
4.6 Oxyburst und Phagozytose über 72 Stunden.....	45
4.7 Glucose, Lactat und LDH über 72 Stunden.....	58
4.8 Elektronenmikroskopie.....	64
4.9 Zusammenfassung.....	66
5. <u>Diskussion</u> .....	68
5.1 Ergebnisse der Aufreinigung.....	68
5.2 Entwicklung der Zellzahl.....	70
5.3 Vitalität.....	72
5.4 pH-Wert.....	73
5.5 Chemilumineszenz.....	75
5.6 Bestimmung von Phagozytose und Oxyburst im Durchflusszytometer.....	76
5.7 Bestimmung von Glucose, Lactat und LDH.....	80
5.8 Elektronenmikroskopie.....	81
6. <u>Zusammenfassung</u> .....	82
7. <u>Ausblick und Bewertung</u> .....	84
8. <u>Thesen</u> .....	85
9. <u>Literaturverzeichnis</u> .....	88
10. <u>Selbstständigkeitserklärung</u> .....	102
11. <u>Danksagung</u> .....	103

## **I. Abbildungsverzeichnis**

<b>Abb. 1:</b> Das Rollen, Adhären und Transmigrieren von Granulozyten an/durch das Endothel ist wesentlich durch die koordinierte Expression von leukozytären und endothelialen Adhäsionsmolekülen gesteuert .....	2
<b>Abb. 2:</b> Schema des extrakorporalen Immununterstützungssystems EISS, mit Zustrom, Abfluss (inklusive Plasmafilter) und Bioreaktor mit Spendergranulozyten.....	12
<b>Abb. 3:</b> Sedimentation nach 40 Minuten.....	18
<b>Abb. 4:</b> Überstände in Zentrifugenröhrchen.....	18
<b>Abb. 5:</b> Lagerung in Zellkulturflaschen.....	19
<b>Abb. 6:</b> Beutellagerung bei 4°C.....	19
<b>Abb. 7:</b> Darstellung eines aufgereinigten Leukozytenkonzentrates (LK) nach durchflusszytometrischer Messung in einem Dotplot-Diagramm.....	24
<b>Abb. 8:</b> durchschnittlicher Anteil von Plättchen (PLT) roten (RBC) und weißen (WBC) Blutzellen im Buffy Coat und nach Aufreinigung im Buffy Coat: HES Verhältnis 2:1 inklusive Spülen des Buffy Coat-Beutels.....	28
<b>Abb. 9:</b> Reduktion der absoluten Zellzahl von Monozyten, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten bei drei verschiedenen Arten der Aufreinigung .....	28
<b>Abb. 10:</b> Zellzahl in Prozent vom Ausgangswert (Leukozytenkonzentrat) nach 24 Stunden.....	30
<b>Abb. 11:</b> Zellzahl in Prozent vom Ausgangswert (Leukozytenkonzentrat) nach 48 Stunden.....	31
<b>Abb. 12:</b> Agglutinationen bei 4°C.....	31
<b>Abb. 13:</b> Zellzahl in Prozent vom Ausgangswert (Leukozytenkonzentrat) nach 72 Stunden.....	32
<b>Abb. 14:</b> vitale Zellen in Prozent im Leukozytenkonzentrat.....	33
<b>Abb. 15:</b> vitale Zellen in Prozent nach 24 Stunden.....	34

<b>Abb. 16:</b> vitale Zellen in Prozent nach 48 Stunden.....	34
<b>Abb. 17:</b> vitale Zellen in Prozent nach 72 Stunden.....	35
<b>Abb. 18:</b> pH-Wert im aufgereinigten Leukozytenkonzentrat.....	36
<b>Abb. 19:</b> pH-Wert nach 24 Stunden.....	37
<b>Abb. 20:</b> pH-Wert nach 48 Stunden.....	37
<b>Abb. 21:</b> pH-Wert nach 72 Stunden.....	38
<b>Abb. 22:</b> Intensität der Chemilumineszenz nach 24 Stunden, Lucigenin.....	39
<b>Abb. 23:</b> Intensität der Chemilumineszenz nach 24 Stunden, Luminol.....	40
<b>Abb. 24:</b> Intensität der Chemilumineszenz nach 48 Stunden, Lucigenin.....	41
<b>Abb. 25:</b> Intensität der Chemilumineszenz nach 48 Stunden, Luminol.....	42
<b>Abb. 26:</b> Intensität der Chemilumineszenz nach 72 Stunden, Lucigenin.....	43
<b>Abb. 27:</b> Intensität der Chemilumineszenz nach 72 Stunden, Luminol.....	44
<b>Abb. 28:</b> Anteil der am Oxyburst beteiligten Zellen ohne (-) und mit (+) Stimulation im Buffy Coat.....	45
<b>Abb. 29:</b> Anteil der am Oxyburst beteiligten Zellen ohne (-) und mit (+) Stimulation im Granulozytenkonzentrat.....	46
<b>Abb. 30:</b> Intensität des Oxyburst, bezogen auf den Buffy Coat im aufgereinigten Granulozytenkonzentrat.....	46
<b>Abb. 31:</b> Anteil der am Oxyburst beteiligten Zellen ohne (-) und mit (+) Stimulation nach 24 Stunden.....	47
<b>Abb. 32:</b> Intensität des Oxyburst, bezogen auf den Buffy Coat nach 24 Stunden.....	48
<b>Abb. 33:</b> Anteil der am Oxyburst beteiligten Zellen ohne (-) und mit (+) Stimulation nach 48 Stunden.....	49
<b>Abb. 34:</b> Intensität des Oxyburst, bezogen auf den Buffy Coat nach 48 Stunden.....	49
<b>Abb. 35:</b> Anteil der am Oxyburst beteiligten Zellen ohne (-) und mit (+) Stimulation nach 72 Stunden.....	50
<b>Abb. 36:</b> Intensität des Oxyburst, bezogen auf den Buffy Coat nach 72 Stunden.....	51

<b>Abb. 37:</b> Anteil der an der Phagozytose beteiligten Zellen ohne (-) und mit (+) Stimulation im Buffy Coat.....	52
<b>Abb. 38:</b> Anteil der an der Phagozytose beteiligten Zellen ohne (-) und mit (+) Stimulation im Granulozytenkonzentrat.....	52
<b>Abb. 39:</b> Intensität der Phagozytose, bezogen auf den Buffy Coat im aufgereinigten Granulozytenkonzentrat.....	53
<b>Abb. 40:</b> Anteil der an der Phagozytose beteiligten Zellen ohne (-) und mit (+) Stimulation nach 24 Stunden.....	54
<b>Abb. 41:</b> Intensität der Phagozytose, bezogen auf den Buffy Coat nach 24 Stunden.....	54
<b>Abb. 42:</b> Anteil der an der Phagozytose beteiligten Zellen ohne (-) und mit (+) Stimulation nach 48 Stunden.....	55
<b>Abb. 43:</b> Intensität der Phagozytose, bezogen auf den Buffy Coat nach 48 Stunden.....	56
<b>Abb. 44:</b> Anteil der an der Phagozytose beteiligten Zellen ohne (-) und mit (+) Stimulation nach 72 Stunden.....	57
<b>Abb. 45:</b> Intensität der Phagozytose, bezogen auf den Buffy Coat nach 72 Stunden.....	57
<b>Abb. 46:</b> Glucosekonzentration in mmol/l im Buffy Coat.....	58
<b>Abb. 47:</b> Konzentration von Lactat in mmol/l und Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) in Units/l im Buffy Coat.....	59
<b>Abb. 48:</b> Glucosekonzentration in mmol/l im Plasma nach 0 Stunden.....	59
<b>Abb. 49:</b> Konzentration von Lactat in mmol/l und Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) in Units/l im Granulozytenkonzentrat.....	60
<b>Abb. 50:</b> Glucosekonzentration in mmol/l nach 24 Stunden.....	60
<b>Abb. 51:</b> Konzentration von Lactat in mmol/l und Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) nach 24 Stunden.....	61
<b>Abb. 52:</b> Glucosekonzentration in mmol/l nach 48 Stunden.....	62
<b>Abb. 53:</b> Konzentration von Lactat in mmol/l und Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) nach 48 Stunden.....	62
<b>Abb. 54:</b> Glucosekonzentration in mmol/l nach 72 Stunden.....	63
<b>Abb. 55:</b> Konzentration von Lactat in mmol/l und Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) nach 72 Stunden.....	63
<b>Abb. 56:</b> LK direkt nach Aufreinigung.....	64

<b>Abb.57:</b> Granulozyt direkt nach Aufreinigung.....	64
<b>Abb. 58:</b> LK nach 24 Stunden ohne Dexamethason.....	65
<b>Abb. 59:</b> LK nach 24 Stunden mit Dexamethason.....	65
<b>Abb. 60:</b> Granulozyt nach 48 Stunden.....	65
<b>Abb. 61:</b> LK nach 48 Stunden mit Dexamethason.....	65
<b>Abb. 62:</b> LK nach 72 Stunden.....	65
<b>Abb. 63:</b> LK nach 72 Stunden (Dexamethason).....	65

## V. Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Prävalenz und Letalität der Sepsis weltweit, in den USA, in Europa und Deutschland.....	4
<b>Tab. 2:</b> Definition des Systemischen inflammatorischen Response Syndroms (SIRS), der Sepsis, der schweren Sepsis und des septischen Schocks nach der ACCP/SCCM Konsensus-Konferenz.....	5
<b>Tab.3:</b> für die Versuche verwendete Geräte.....	15
<b>Tab. 4:</b> für die Versuche verwendete Materialien.....	16
<b>Tab. 5:</b> Versuchsreihen.....	20
<b>Tab. 6:</b> Pipettierschema Chemilumineszenz, modifiziert nach A. Lübcke.....	23
<b>Tab. 7:</b> Pipettierschema Durchflusszytometrie, modifiziert nach A. Lübcke.....	25
<b>Tab. 8:</b> Zellzahlen $\times 10^9$ von Leukozyten (WBC), Thrombozyten (PLT) und Erythrozyten (RBC) im Buffy Coat (BC) und nach drei verschiedenen Arten der Aufreinigung.....	27
<b>Tab. 9:</b> Auflistung der 5 erfolgreichsten Lagerungsbedingungen von oben nach unten, mit den Ergebnissen der einzelnen Untersuchungen nach 72 Stunden.....	66
<b>Tab. 10:</b> Zellzahlen von Erythrozyten, neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Plättchen in verschieden hergestellten Leukozytenkonzentraten.....	69

## **VI. Abkürzungen**

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
ARDS	Acute respiratory distress syndrome (Akutes Lungenversagen)
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BC	Buffy Coat
BC 1:1	Aufreinigung des BC mit HES im Verhältnis 1:1
BC 2:1	Aufreinigung des BC mit HES im Verhältnis 2:1
BC 2:1+	Aufreinigung des BC mit HES im Verhältnis 2:1, wobei vorher der Beutel mit der entsprechenden Menge HES ausgespült wurde
BGA	Blutgasanalyse
CaMg	Calcium/Magnesium
CARS	Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome - (kompensatorisches anti-inflammatorisches Response-Syndrom)
CD4 (T-Zellen)	Cluster of differentiation (Unterscheidungsgruppen)
Chemi	Chemilumineszenz
CPD	Zitrat-Puffer, Natriumdihydrogenphosphat, Glukose, Adenin
DHR 123	Dihydrorhodamin 123
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EISS	Extracorporeal Immune Support System
FITC	Fluorescein Isothicyanat
G - CSF	Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor
GK	Granulozytenkonzentrat (synonym mit Leukozytenkonzentrat verwendet)
GM - CSF	Granulozyten Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HES/HAES	Hydroxyethylstärke
HLA-DR	Humanes Leukozyten Antigen – Antigen D vermittelt (relatet)
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
KCl	Kaliumchlorid
LDH	Lactatdehydrogenase

LK	Leukozytenkonzentrat (synonym mit Granulozytenkonzentrat verwendet)
LPS	Lipopolysaccharide
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PLT	Platelets (Blutplättchen)
RBC	Red Blood Cells (rote Blutzellen)
RT	Raumtemperatur
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SOFA-Score	Sepsis-related Organ Failure Assessment score (auf die Sepsis bezogene Bewertungszahl des Organversagens)
Tab.	Tabelle
TNF	Tumor Nekrosefaktor
TSST-1	Toxisches Schocksyndrom Toxin
WBC	White Blood Cells (weiße Blutzellen)
V-ATPase	ATPasen, die sich in den Membranen der Vakuolen befinden
X-Vivo	Serum-freies hämatopoetisches Zellmedium

# **1. Einleitung**

## **1.1 Leukozyten**

Weißer Blutzellen -Leukozyten- bilden den Hauptteil des zellulären Immunsystems und erfüllen zahlreiche Aufgaben in der Abwehr von Krankheitserregern sowie körperfremder Strukturen. Am gängigsten ist die Einteilung in Granulozyten und mononukleäre Zellen. Zu den mononukleären Zellen zählen die Lymphozyten und Monozyten, zu den Granulozyten die neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten (1). Die Granulozyten verdanken ihren Namen ihren unterschiedlichen, im Zytoplasma vorhandenen Granula, die verschiedene Enzyme zur Abwehr von Erregern enthalten. Der Anteil weißer Blutzellen beträgt insgesamt etwa 4000 - 11000/µl Blut. Anteilig setzen sich die Leukozyten wie folgt zusammen:

Neutrophile Granulozyten 60 - 70%

Eosinophile Granulozyten 2 - 4 %

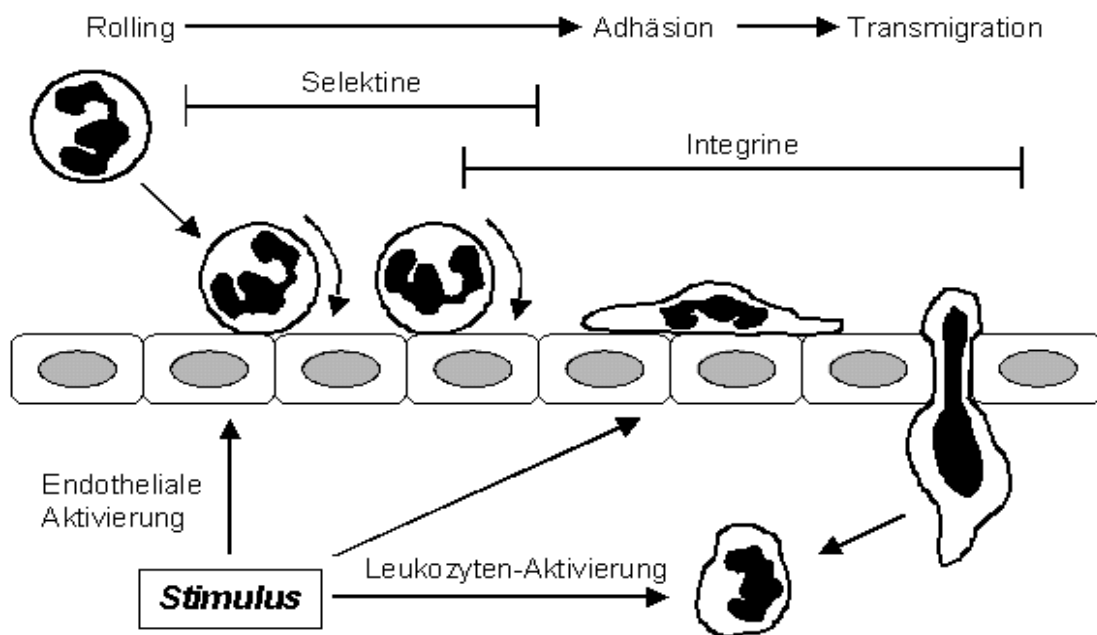
Basophile Granulozyten 0 - 1%

Lymphozyten 20 - 30 %

Monozyten 3 - 8% (1).

Den größten Anteil an den Leukozyten bilden die neutrophilen Granulozyten, auch polymorphkernige Granulozyten oder kurz Neutrophile genannt. Sie sind Teil des angeborenen, zellulären Immunsystems. Ihre Funktion besteht in der Infektabwehr und dem Abbau von körpereigenem nekrotischem Material. Die Bildung der Neutrophilen erfolgt im Knochenmark, von wo sie über die Blutbahn zu ihrem Bestimmungsort, dem Bindegewebe der Organe, gelangen. Die Verweildauer im Blut beträgt dabei lediglich sechs bis sieben Stunden. Im Bindegewebe überleben sie, je nach Beanspruchung, bis zu vier Tage. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgt der Zelltod durch Apoptose (1). Insgesamt befinden sich ca. 20 Milliarden Neutrophile im Blut (zirkulierender Pool), 20 Milliarden an den Gefäßwänden von Lunge und Milz (marginaler Pool) und 40 Milliarden im Knochenmark (Knochenmarkspool). Der marginale- und der Knochenmarkspool dienen als schnell mobilisierbare Reserve, die im Falle einer Infektion oder Entzündung ins Blut ausgeschüttet wird und in die betroffenen Organe gelangen kann (1). Neutrophile Granulozyten verfügen über verschiedene Eigenschaften und Fähigkeiten zur Abwehr und dem Abbau körpereigener und fremder Stoffe.

Zum einen besteht die Fähigkeit zur Einwanderung ins Gewebe (Emigration). An diesem Schritt sind sowohl Endothelzellen als auch die Neutrophilen selbst beteiligt (2). In verletztem oder infiziertem Gewebe schütten betroffene Zellen, Mastzellen oder Gewebsmakrophagen Mediatoren wie Histamin, Interleukin 1 oder TNF- $\alpha$  aus, die zu einer Aktivierung mikrovaskulärer Endothelzellen führen. Es kommt zur Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle (E- und P-Selektin, L-Selektin-Ligand), die mit den Leukozyten interagieren und zu einer Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit führen (3). Dadurch wiederum kommen die Leukozyten verstärkt mit den vom Endothel ausgeschütteten Entzündungsmediatoren in Kontakt (Platelet Activating Factor, Interleukin 8), die wiederum  $\beta_2$ -Integrine -die Adhäsionsmoleküle der Leukozyten aktivieren, so dass es zu einer festen Adhäsion der Zellen an die Endothelwand kommen kann. Diese Bindung ist Voraussetzung für die Einwanderung der Leukozyten ins Gewebe (4).



**Abb. 1:** Das Rollen, Adhären und Transmigrieren von Granulozyten an/durch das Endothel ist wesentlich durch die koordinierte Expression von leukozytären und endothelialen Adhäsionsmolekülen gesteuert (5).

Weiterhin sind Leukozyten zur Chemotaxis und amöboiden Fortbeweglichkeit fähig. Die Bewegung der Leukozyten im entzündeten Gewebe erfolgt gesteuert durch Chemotaxine wie Platelet Activating Factor, Leukotriene, Interleukine, Komplementfaktoren oder Bakterienbestandteile innerhalb der extrazellulären Matrix (2).

Neutrophile Granulozyten verfügen zudem über die Fähigkeit, durch Veränderungen in ihrem Zytoskelett Pseudopodien (zytoplasmatische Fortsätze) auszubilden, mit denen sie Erreger umschließen können (1). Die Erkennung der zu phagozytierenden Mikroorganismen oder Zellen wird durch die Opsonierung der Oberfläche mittels Komplementfaktoren oder durch Immunglobuline unterstützt (6). Die um den Erreger gebildete Vakuole wird als Phagosom bezeichnet. Durch Verschmelzung des Phagosoms mit den Granula der Leukozyten entsteht das Phagolysosom und die in den Granula enthaltenen mikrobioziden Enzyme werden aktiviert. Es handelt sich hierbei unter anderem um Myeloperoxidase, Proteasen, Defensine, Lysozym, Laktoferrin und Proteine für den NADPH- Oxidase- Komplex sowie Gelatinase. Mit Hilfe der V-ATPase kommt es außerdem zur Absenkung des pH-Wertes im Phagolysosom. Die phagozytierten Bestandteile können so vollständig abgebaut und im Zellmetabolismus wiederverwendet werden (1, 7).

Neben der Phagozytose kommt es durch Aktivierung des NADPH-Oxidase-Komplexes zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, dem sogenannten Oxyburst. Die NADPH-Oxidase ist ein Multienzymkomplex, der aus einer membranständigen und mehreren zytosolischen Komponenten besteht. Erst bei einer Aktivierung der Zelle kommt es zu einer Assoziation der zytosolischen Bestandteile an das membranständige Element (8). Unter Verbrauch von NADPH erfolgt die Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff, wodurch Superoxidradikale ( $O_2^-$ ) im Inneren des Phagolysosoms entstehen.



Durch andere Reaktionen können weitere Radikale entstehen:

- $2 O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{\text{Superoxiddismutase}} H_2O_2 + O_2$
- $NaCl + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Myeloperoxidase}} NaClO^- \text{ (Natriumhypochlorit)} + H_2O$
- $H_2O_2 \xrightarrow{\text{Laktoferrin}} 2 HO\cdot \text{ (Hydroxylradikal)}$
- $O_2^- + NO \rightarrow ONOO^- \text{ (Peroxynitrit)}$

Durch diese aggressiven Verbindungen können eine große Zahl von Bakterien, Viren, Pilzen und auch Parasiten abgetötet werden (7).

## 1.2 Sepsis

Laut einer Studie des Kompetenznetzes Sepsis (SepNet) erkranken in Deutschland jährlich ca. 154.000 Menschen an einer Sepsis, etwa 56.000 von ihnen versterben an der Erkrankung. Damit ist die Sepsis in Deutschland die dritthäufigste Todesursache nach dem Myokardinfarkt und der Herzinsuffizienz. Der Anteil an Patienten, die die Kriterien einer Sepsis und schweren Sepsis erfüllen, beträgt auf deutschen Intensivstationen 12,4% bzw. 11%. Die Kosten für die Behandlung belaufen sich auf schätzungsweise 1,7 Milliarden Euro pro Jahr, was in etwa 32% der Gesamtkosten deutscher Intensivstationen ausmacht (9, 10). Die Häufigkeit wird innerhalb der Industrieländer (ohne Deutschland) mit 51-300/100.000 Einwohner angegeben. Damit liegt die Häufigkeit über der von Erkrankungen wie zum Beispiel Dickdarmkrebs (50/100.000), Brustkrebs (110/100.000) und AIDS (17/100.000) (11).

**Tab. 1: Prävalenz und Letalität der Sepsis weltweit, in den USA, in Europa und Deutschland (11).**

	<b>Erkrankungen/ Jahr</b>	<b>Todesfälle/ Jahr</b>	<b>Sterberate</b>
<b>Weltweit</b>	1.500.000	500.000	33,3 %
<b>USA</b>	749.129	215.000	28,7 %
<b>Europa</b>	550.000	146.000	26,5 %
<b>Deutschland</b>	154.000	56.000	36,4 %

„Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem kontinuierlich oder periodisch pathogene Bakterien in den Kreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“ (Hugo Schottmüller, 1914) (12).

Im Gegensatz zu dieser Definition Schottmüllers hat sich in den letzten Jahren ein neueres Verständnis zur Pathogenese der Sepsis durchgesetzt. Vor allem die entzündliche Reaktion des Organismus wird als entscheidender Beitrag zur Pathogenese gesehen (13). Es werden 4 Schweregrade der systemischen Entzündungsreaktion unterschieden, die in der untenstehenden Tabelle aufgezählt werden.

**Tab. 2 Definition des Systemischen inflammatorischen Response Syndroms (SIRS), der Sepsis, der schweren Sepsis und des septischen Schocks nach der ACCP/SCCM Konsensus-Konferenz, 1992 (14).**

SIRS (mindestens zwei Kriterien)	Körpertemperatur > 38 °C oder < 36 °C Tachykardie: Herzfrequenz > 90/min Tachypnoe: Atemfrequenz > 20/min oder Hyperventilation Leukozytose oder Leukopenie oder > 10 % unreife neutrophile Granulozyten im Differentialblutbild
Sepsis	SIRS, verursacht durch eine Infektion
Schwere Sepsis (mindestens ein Kriterium)	SIRS und mindestens eines der folgenden Kriterien: Hirnschädigung (Enzephalopathie) Thrombozytopenie Hypoxie Akutes Nierenversagen Metabolische Azidose Arterielle Hypotension → septischer Schock
Septischer Schock	SIRS + Arterielle Hypotension (systolischer arterieller Blutdruck < 90 mmHg oder mittlerer arterieller Blutdruck < 70 mmHg über mindestens eine Stunde trotz adäquater Volumenzufuhr bei Abwesenheit anderer Schockursachen)

Anfang 2016 wurde eine neue Definition der Sepsis und des septischen Schocks vorgestellt. Erarbeitet wurde diese von internationalen Spezialisten im Auftrag der zwei führenden Fachgesellschaften (European Society of Intensive Care Medicine und der Society of Critical Care Medicine). Hervorgehoben wird hier die „lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer fehlregulierten Körperantwort auf eine Infektion“ (15). Die SIRS-Kriterien werden als zu unspezifisch und klinisch wenig nützlich eingestuft, da sie auch bei unkomplizierten Infektionen oder nicht infektiös bedingt auftraten und andererseits bei schwer erkrankten Patienten fehlen können. Bedeutend für die Prognose seien die Folgen der Organdysfunktion, die mit dem SOFA-Score (Sequential/Sepsis-Related Organ Failure Assessment Score) erfasst werden; dieser beinhaltet 6 Kriterien: Atmung, Blutgerinnung, Leberfunktion, Herzkreislauffunktion, Glasgow Coma-Scale und Nierenfunktion. Eine akute Verschlechterung des SOFA-Scores um 2 oder mehr Punkte ist

mit einem Mortalitätsanstieg von ungefähr 10 Prozent verbunden. Der qSOFA (q für quick) ist eine neue vereinfachte Form, die die schnelle Einschätzung präklinisch oder in der Notaufnahme möglich machen soll. Die drei Kriterien sind eine Atemfrequenz > 22/min, verändertes Bewusstsein und ein systolischer Blutdruck < 100 mmHg. Bei zwei erfüllten Kriterien ist von einem schlechteren Outcome auszugehen. Der septische Schock wird weiter als Untergruppe der Sepsis mit deutlich erhöhter Mortalität definiert. Neben der Hypotension trotz ausreichender Flüssigkeitsgabe wird als neues zusätzliches Kriterium ein Anstieg der Laktatkonzentration auf über 2 mmol/l angeführt. Durch die neuen Kriterien soll die Unterscheidung zu anderen Arten des Kreislaufschocks verbessert und eine frühe Erkennung der Verschlechterung des Zellstoffwechsels ermöglicht werden (15).

Zur Pathophysiologie der Sepsis gibt es verschiedene Theorien. Oberholzer beschrieb 2001 zwei Ursachen für die Entstehung einer systemischen Inflammation: zum einen durch das Eindringen von Mikroorganismen und zum anderen durch Verletzung und Absterben von Gewebe in Folge eines Traumas (16). Die häufigsten Ursachen einer Sepsis bilden Pneumonien, Infektionen des Bauchraums, der Harnwege, der Weichgewebe und intravasculäre Katheter (17). Bei 90% der Erreger handelt es sich um grampositive und gramnegative Bakterien, 5 Prozent der Erkrankungen werden jeweils durch Pilze und durch Viren und andere Erreger verursacht. Bei einem Drittel der Patienten mit dem Bild einer Sepsis kann kein Erreger nachgewiesen werden (18).

Hotchkiss beschrieb 2003 verschiedene Theorien zur Pathophysiologie der Sepsis. Zum einen diskutierte er die Sepsis als eine außer Kontrolle geratene Entzündungsreaktion, bei der Zellen des Immunsystems und deren Zytokine Schäden an Organen verursachen was schließlich zum Organversagen führt. Zum anderen beschrieb er auch immunsuppressive Effekte, die im Verlauf der Erkrankung zu Apoptose und Anergie (reduzierte Reaktion auf Antigene) von Immunzellen führen (19). In der ersten Phase einer Immunreaktion gegen Bakterien spielen neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen als Vertreter des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle. Sie produzieren nach Kontakt mit (durch Komplementfaktoren opsonierten) Mikroorganismen proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Interleukin 1, 6, 12 und 18. Die Abwehr von Viren erfolgt vor allem durch natürliche Killerzellen. Weiterhin verfügen antigenpräsentierende Zellen wie Monozyten und Makrophagen aber auch B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen über die Fähigkeit, Mikroorganismen oder ihre Bestandteile aufzunehmen, deren Antigene zu

präsentieren und damit T-Lymphozyten zu aktivieren und weitere Immunprozesse in Gang zu setzen (20). Auslöser entzündlicher Reaktionen sind zum Beispiel Lipopolysaccharide (LPS) als Membranbestandteile gramnegativer Bakterien. Wichtige Trigger einer grampositiven Sepsis können hingegen Exotoxine wie das toxic shock syndrome toxin (TSST-1), produziert von *Staphylococcus aureus* sein (18). Bakterielle Bestandteile wie LPS führen zu einer vermehrten Expressierung von Tissue Faktor auf Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen, was über mehrere Zwischenschritte zur vermehrten Bildung von Fibrin aus Fibrinogen führt. Gleichzeitig verhindern hohe Spiegel von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ I die Bildung von Plasmin aus Plasminogen, was zu vermindertem Abbau von Fibrin und damit zu Verschlüssen in kleineren Gefäßen, der Minderperfusion von Organen und schließlich zu Organversagen führt (18). Weiter verstärkt wird die vermehrte Gerinnungsaktivierung des Blutes durch reduzierte Spiegel der gerinnungshemmenden Eiweiße Protein C, Antithrombin und tissue factor pathway inhibitor (18, 21). Patienten mit schwerer Sepsis sterben häufig an den Folgen von multiplen Organversagen. Als Ursachen dafür gelten neben der Minderperfusion durch Fibringerinsel, sowie hypotone Blutdruckwerte und die verminderte Verformbarkeit der roten Blutkörperchen (22) auch Ödembildungen in den Geweben, Störungen der Mikrozirkulation durch vasoaktive Substanzen wie Histamin, sowie die Infiltration und Schädigung der Gewebe durch neutrophile Granulozyten und reaktive Sauerstoffspezies sowie lysosomale Enzyme (18, 23, 24). Auch Stickoxid (NO), das, induziert durch TNF- $\alpha$  und andere Zytokine, vermehrt gebildet wird, führt zu weiterer Destabilisierung der Gefäße und steht im Verdacht, die myokardiale Depression bei Sepsis mit zu bedingen (18, 24). Es wird auch eine eher funktionelle Natur der im Rahmen einer Sepsis auftretenden Organfehlfunktionen diskutiert. Hotchkiss berichtet 2003 von einer Autopsiestudie an verstorbenen Sepsispatienten. Offensichtlich waren die morphologischen Schäden an Organen wesentlich geringer, als es die Funktionseinbußen zu Lebzeiten der Patienten vermuten ließen (19). Er vermutet hinter dieser Tatsache eine Art Ruhezustand (Winterschlaf) der Zellen, wie er auch bei Myokardischämien bekannt ist (19, 24, 25).

Organschäden durch neutrophile Granulozyten werden vereinzelt diskutiert. Eine schädigende Wirkung im Rahmen einer systemischen Entzündungssituation wird besonders in Zusammenhang mit der Lunge beschrieben. Bei einer Infektion kommt es zur Infiltration des betroffenen Gewebes aus den umgebenden Blutgefäßen. Die Neutrophilen schütten dort reaktive Sauerstoffspezies und proteolytische Enzyme aus, die zum Beispiel im Fall der Lunge zu Schädigung und abnehmender Compliance des Gewebes führen

können. Die Folgen sind hier ein verminderter Gasaustausch und das Akute Respiratorische Distress Syndrom (ARDS) (26). Die Beobachtung, dass neutrophile Granulozyten septischer Patienten vermehrt Adhäsionsmoleküle ausbilden und verstärkt an kulturell gezüchteten Endothelzellen haften, führte zu der Vermutung, dass die Neutrophilen durch die starke Haftung an den Wänden kleiner Gefäße zu Verschlüssen und damit zur Ischämie und Schädigung von Organen führen könnten (23, 24). Diskutiert wird in diesem Zusammenhang auch die pathophysiologische Wirkung der von neutrophilen Granulozyten freigesetzten Netze, die aus fibrillärer Matrix, Granula-Proteinen und Chromatin entstehen und Pathogene binden (27). Es gibt Hinweise darauf, dass es durch die im Rahmen einer Sepsis hohe Anzahl an vorhandenen Netzen zu Schäden im entzündeten Gewebe kommen kann (27, 28), insbesondere dem Verschluss kleinerer Gefäße und damit zu einer Störung der Mikrozirkulation sowie einer enzymatischen Schädigung des umgebenden Gewebes (27, 29). Die Gabe von Granulozyten Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF) zur Erhöhung der Anzahl neutrophiler Granulozyten an septische Patienten in zwei Studien zeigte jedoch wiederum keine negativen Folgen für das Überleben. Es handelte sich um Patienten mit ambulant und nosokomial erworbener Pneumonie. Es zeigten sich nach der Gabe von G-CSF und dem Anstieg der Neutrophilen keine negativen Effekte auf die Lungenfunktion, jedoch kam es auch nicht zu einer Reduzierung der Liegedauer auf der Intensivstation oder der Mortalität (30, 31).

Ebenfalls im Rahmen der Sepsis wird das kompensatorische antiinflammatorische Response Syndrom (CARS) beschrieben. Es ist gekennzeichnet durch eine Suppression des Immunsystems. Charakteristisch sind hierbei Anergie von Leukozyten, Apoptose von Lymphozyten und zunehmende Ausschüttung immunsuppressiver Zytokine, wie Interleukin 10. Bei Monozyten kommt es zu einem verminderten Ansprechen auf proinflammatorische Zytokine, Verlust der HLA-DR Expression und reduzierter Antigenpräsentation (32, 33). Zudem kann die Entzündungsreaktion auch über neuronale Mechanismen gehemmt werden. Durch Stimulation des Vagusnervs kommt es über eine Aktivierung des Plexus coeliacus zu einer Ausschüttung von Norepinephrin in der Milz und Acetylcholin durch bestimmte CD4<sup>+</sup> T-Zellen, was im Endeffekt über cholinerge Rezeptoren von Makrophagen die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine hemmt (34, 35). Nach klinischen Beobachtungen sterben viele Patienten, die an einer Sepsis leiden, nicht während der akuten Entzündungsreaktion, sondern erliegen bei Nachlassen der Immunreaktion sekundären Infektionen. Weiterhin entwickeln Patienten in schlechtem

gesundheitlichem Zustand oft kaum die typischen Zeichen der Entzündung, sondern im Gegenteil niedrige Leukozytenzahlen und Körpertemperaturen (33).

Kausale Therapiemöglichkeiten der Sepsis bestehen laut AWMF Leitlinien in der Fokussanierung und der antimikrobiellen Therapie. Unterstützend werden Maßnahmen zur initialen und fortsetzenden hämodynamischen Stabilisierung empfohlen. Dazu zählen die Volumentherapie und die Therapie mit Inotropika und Vasopressoren. Weiterhin kommen Nierenersatzverfahren sowie Airway-Management und Beatmung zum Einsatz (13). Als adjunktive Therapien werden genannt: die Gabe von Immunglobulinen (36), Kortikosteroiden (35) und Selen, sowie Antithrombin und aktiviertem Protein C zur positiven Beeinflussung der gestörten Blutgerinnung (36). Aktiviertes Protein C hatte zwar eine Zulassung zur Sepsis-Behandlung erhalten (37), in einer nachfolgenden Studie zeigte sich jedoch kein Vorteil durch die Behandlung, weswegen das Medikament wieder vom Markt genommen wurde (38). Die intensivierete Insulintherapie hat sich als nicht lebensverlängernd erwiesen und begünstigt eher das Entstehen von Hypoglykämien (39, 40). Die „Surviving Sepsis Campaign“, ein internationales Konsortium von Fachgesellschaften der Intensiv- und Notfallmedizin sowie der Infektiologie empfiehlt hierzu aktuell den Beginn einer Insulintherapie bei zweimalig hintereinander gemessenen Blut-Glucosespiegeln über 180 mg/dl (41). Aktuelle Studien beschäftigen sich zudem mit der Entfernung von Endotoxinen durch Polymyxin- B Hämoperfusion, Toll-like Rezeptor Inhibitoren und der Gabe von GM- CSF zur Vorbeugung der Immunsuppression, die im Verlaufe einer Sepsis auftreten kann (32).

### **1.3 Transfusion von Blutbestandteilen**

Zu den zellulären, therapeutisch verwendeten Blutkomponenten zählen Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten (42). Weiterhin verwendete nicht-zelluläre Komponenten sind Frischplasma, Faktor VIII-Konzentrate, Prothrombinkomplexpräparate, Protein C- und Antithrombin-Konzentrate sowie Humanalbumin, humane Immunglobuline und gentechnisch hergestellte Gerinnungsfaktoren- und -inhibitorenpräparate (43). Die Transfusion von Blutkomponenten kommt zum Beispiel bei großen Blutverlusten durch Operationen oder Verletzungen und in besonderem Maße auch bei Tumorpatienten zum Tragen (44). Bis auf wenige Ausnahmen führen die zur Chemotherapie verwendeten Zytostatika zu einer Suppression des Knochenmarks und damit zu Anämien, Thrombopenien und Leukopenien (45). Während die Transfusion von Thrombozyten und

Erythrozyten seit Jahren etabliert ist, wird die Behandlung mit Granulozyten wegen eines Mangels überzeugender randomisierter Kontrollstudien bei Neutropenien nicht als Standardtherapie empfohlen (46, 47). Mögliche beschriebene Indikationen für den Einsatz von Leukozyten-/Granulozytenkonzentraten sind therapieresistente, lebensbedrohliche Infektionen bei einem Neutrophilenwert unter 500/ $\mu$ l, die Sekundärprophylaxe bei einer erwarteten Neutropeniedauer von mindesten 10 Tagen oder nach vorangegangener invasiver Aspergillose (48, 49).

Strauss beschreibt in einem Review von 2012 zur Transfusion von Granulozytenkonzentraten die Ergebnisse von sieben kontrollierten Studien im Zeitraum von 1972 bis 1982, bei denen neutropene Patienten, die unter einer Infektion litten, entweder mit Granulozytenkonzentraten und Antibiotika oder nur mit Antibiotika behandelt wurden (46). Graw berichtete 1972 in der ersten dieser Studien über Granulozytentransfusionen bei Patienten mit nachgewiesener oder wahrscheinlicher Gramnegativer Sepsis. Patienten, die vier Granulozytentransfusionen erhielten, überlebten zu 100 %, Patienten mit drei Granulozytentransfusionen zu 80 %. In der Kontrollgruppe überlebten lediglich 30 Prozent (50). 1975 konnten auch in einer Studie von Higby Überlebensvorteile durch die Transfusion von Granulozytenkonzentraten nachgewiesen werden (51). Studien von Herzig, Vogler und Winston zeigten, dass Patienten mit prolongierter Neutropenie von Granulozytentransfusionen profitierten (53, 54), jedoch nicht bei einer Dosierung unter  $0,3 \times 10^{10}$  Zellen (53). Winston berichtete 1982 erneut über ein fehlendes Ansprechen auf die Transfusion niedrigerer Granulozytendosen ( $0,5 \times 10^{10}$  Granulozyten pro Transfusion) (55). In zwei weiteren Studien von Graw (50) sowie Alavi (56) zeigten sich nur teilweise Erfolge. Insgesamt ergab sich in drei der sieben Studien ein Vorteil für alle mit Granulozytenkonzentraten behandelten Patienten, in zwei weiteren Studien profitierten nur bestimmte Untergruppen von der Behandlung. Die „erfolgreichen“ Gruppen unterschieden sich von den restlichen durch die Gabe höher dosierter Granulozytenkonzentrate mit Zellzahlen von  $1-7 \times 10^{10}$  Zellen pro Tag. Weiterhin waren sowohl die Spendererythrozyten als auch die Leukozyten mit denen der Empfänger kompatibel (46, 50-56). Die Analyse von fünf Fallberichten und weiteren acht unkontrollierten Studien, veröffentlicht zwischen 1995 und 2002, erlaubte auf Grund großer Unterschiede der einzelnen Studien und Berichte keine verbindlichen Aussagen zur Wirksamkeit von Granulozytentransfusionen. Den meisten Berichten war jedoch gemeinsam, dass bakterielle und leichtere Pilzinfektionen jeweils gut beziehungsweise mäßig auf die Behandlung anzusprechen schienen. Schwere Pilzinfektionen begleitet von

Organschäden reagierten hingegen selbst auf hochdosierte Behandlung nicht ausreichend (46, 57, 58, 59). Prophylaktische Transfusionen mit niedrig dosierten Granulozytenkonzentraten bei Neutropenie ergaben keine eindeutigen Ergebnisse. Während sich in einigen Studien kaum Erfolge zeigten (46, 60), konnte in anderen nach autologer (61) und allogener (62, 63, 64) Stammzelltransplantation die Dauer der Neutropenie sowie die Inzidenz und Schwere einer Sepsis reduziert werden. Wegen dem hohen Aufwand bei der Gewinnung von Granulozyten und der geringen Ausbeute bei alleiniger Stimulierung mit Kortikosteroiden ließ das Interesse an Granulozytentransfusionen vorerst nach (65, 66). Mit der Entdeckung der Wirkung von G-CSF stieg das Interesse ab den neunziger Jahren wieder an, da erheblich größere Mengen an Granulozyten von einzelnen Spendern gewonnen werden konnten (67, 68, 69). Bei Kindern hingegen wurden wegen der viel geringer benötigten Zellzahlen auch weiterhin Granulozytentransfusionen bei neonataler Leukopenie und Sepsis angewandt (70, 71). Neben der Behandlung der leukopenen Sepsis wird die Transfusion von Granulozytenkonzentraten auch noch im Zusammenhang mit angeborenen Funktionsstörungen der neutrophilen Granulozyten, wie beispielsweise der chronischen Granulomatose diskutiert (72, 73).

#### **1.4 Gewinnung von Granulozyten**

Granulozytenkonzentrate werden heute mittels maschineller Apherese gewonnen. Die Apherese ist eine Methode zur selektiven extrakorporalen Elimination von Blutbestandteilen. Sie wird zum einen als therapeutisches Verfahren bei Fettstoffwechselkrankheiten, Autoimmunprozessen oder zur Toxinelimination, zum anderen aber auch zur Spende von ausgewählten Blutbestandteilen wie Thrombozyten, Blutplasma oder Leukozyten eingesetzt (74). Die Gewinnung von Leukozyten erfolgt normalerweise mittels Durchflusszentrifugation. Dabei wird das Blut des Spenders über ein Schlauchsystem in eine Zentrifuge geleitet. Dort werden die Blutbestandteile abhängig von ihrer Masse in einem künstlichen Schwerfeld in Schichten aufgetrennt. Erythrozyten werden in der Rotationstrommel in die Peripherie geschleudert, während das Plasma an der Innenseite verbleibt. In der Mitte befindet sich der Buffy Coat, der hohe Anteile an Leukozyten enthält. Der Buffy Coat wird letztendlich in einen Sammelbeutel abgeleitet und die anderen Blutbestandteile wieder an den Spender zurückgeleitet (75). Zur Beschleunigung der Auftrennung von Leukozyten und Erythrozyten wird HES als

Sedimentationsbeschleuniger verwendet. Wegen der Gefahr allergischer Reaktionen, sollte vor der Apherese die intravenöse Gabe einer kleinen Menge an HES erfolgen. Zudem ist die Möglichkeit einer Granulozytenspende wegen des durch HES häufiger ausgelösten Juckreizes auf maximal vier Mal pro Jahr beschränkt (76). Um eine ausreichende Menge an Granulozyten gewinnen zu können, werden Spender mit Glukokortikoiden und/oder G-CSF vorbehandelt. G-CSF ist jedoch für diese Indikation nicht zugelassen. Die Verabreichung kann daher nur im Rahmen von Studien, mit Genehmigung einer Ethikkommission und einer Probandenversicherung erfolgen (77).

### 1.5 Das extrakorporale Immununterstützungsverfahren EISS

Trotz Antibiotikatherapie und intensivmedizinischer Behandlung sterben auch heute in Deutschland noch ein Drittel der an einer Sepsis erkrankten Patienten (11), so dass die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten weiterhin aktuell bleibt. Als mögliche neue Behandlungsmethode forscht die Arbeitsgruppe um Altrichter, Mitzner und Sauer an einem extrakorporalen Immununterstützungssystem (Extracorporeal Immun Support System - EISS) (78). Basierend auf dem Prinzip der Plasmapherese, gelangt das Plasma eines erkrankten Patienten nach Plasmaseparation in einen abgetrennten Kreislauf, in dem Blutzellen, insbesondere die Granulozyten eines gesunden Spenders zirkulieren. Zurückgehalten werden die Zellen durch einen Plasmafilter mit einer Porengröße von ca.  $0,5\mu\text{m}$ . So wird verhindert, dass Spenderzellen bzw. Zelltrümmer in den Organismus des Patienten gelangen und dort möglicherweise negative Effekte auslösen. Der Plasmarrückstrom zum Patienten wird druckgesteuert über den Zustrom reguliert. (78, 79).

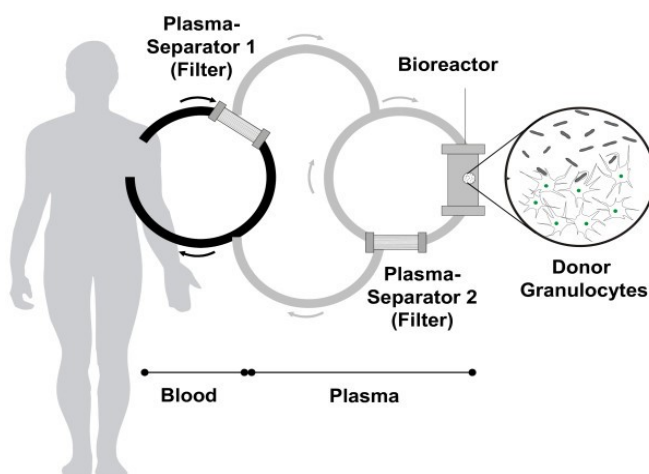


Abb.2: Schema des extrakorporalen Immununterstützungssystems EISS, mit Zustrom, Abfluss (inklusive Plasmafilter) und Bioreaktor mit Spendergranulozyten (78).

Die Sicherheit und Effektivität der Methode wurde durch eine tierexperimentelle Studie mit drei Gruppen sedierter, spontan atmender, weiblicher Schweine nachgewiesen. Je sieben Schweine pro Gruppe erhielten eine letale Dosis lebender *Staphylococcus aureus*-Bakterien in Form einer Infusion. Gruppe I erhielt keine Therapie, alle sieben Tiere verstarben im Beobachtungszeitraum. Gruppe II und III wurden entweder mit einem leeren Bioreaktor, oder mit einem, der Zellen einer humanen Granulozytenzelllinie enthielt, behandelt. In Gruppe II überlebten zwei von sieben, in Gruppe III, sechs von sieben Tieren. Die Studie kam zu dem Ergebnis, dass die Behandlung des Plasmas mit Spendergranulozyten bei den Tieren zu einer signifikanten Verbesserung des Überlebens im siebentägigen Beobachtungszeitraum führte. Es wurden keine Anzeichen einer allergischen Reaktion auf die menschlichen Granulozyten beobachtet. Auch gab es keinen Anhalt für andere negative Effekte auf den Verlauf der Erkrankung (79). 2010 wurde eine erste klinische Studie an 10 Patienten mit septischem Schock durchgeführt. Die Patienten wurden innerhalb von 72 Stunden zwei Mal für jeweils sechs Stunden mit dem extrakorporalen System behandelt und über 28 Tage beobachtet. Die Granulozyten wurden von einem blutgruppengleichen und mit Methylprednisolon stimulierten Spender gewonnen. Die Noradrenalin-Dosierung der Patienten konnte signifikant reduziert werden und die Spiegel des C-reaktiven Proteins (CRP) und Procalcitonins (PCT) fielen deutlich ab. Es kam weiterhin zu einem signifikanten Anstieg der Leukozytenzahl und von Interleukin (IL) 1- $\beta$ , IL-6, IL-8 und IL-10. Unerwünschte Wirkungen durch die Spendergranulozyten konnten nicht beobachtet werden. Die Sterblichkeit lag nach 28 Tagen bei drei von 10, abschließend bei vier von 10 Patienten. Insgesamt konnten in der Pilotstudie die Sicherheit der Methode bei Anwendung am Menschen nachgewiesen sowie Hinweise in Richtung Effektivität erhoben werden (78). Sollte sich die Behandlung septischer Patienten mittels der extrakorporalen Immununterstützung auch in weiteren Studien als wirksam erweisen, würde die Verfügbarkeit von Granulozytenkonzentraten stärker ins Blickfeld rücken. Hierbei würde sich sowohl die Frage nach einer einfacheren Gewinnung als auch nach längerer Haltbarkeit stellen.

## **2. Zielsetzung**

Einen gewichtigen Grund für die nur begrenzte Anwendung von Granulozytenkonzentraten stellt die fehlende Lagerungsmöglichkeit dar. Zudem verzögert sich durch die Suche nach einem Spender und die anschließende Herstellung eines frischen Granulozytenkonzentrates die Verfügbarkeit erheblich - Granulozytenkonzentrate sind nicht konstant vorrätig, wie beispielsweise Erythrozytenkonzentrate. So geht durch die Herstellung auch Zeit für eine eventuell dringend benötigte Behandlung verloren.

Arbeitsgruppeninterne Versuche konnten zeigen, dass es möglich ist, die für eine wirkungsvolle Therapie als nötig angesehene Menge von  $2-4 \times 10^{10}$  Granulozyten (46) aus ca. 30 Buffy Coats nicht vorstimulierter Blutspender zu gewinnen. Die Gewinnung der Zellen aus Buffy Coats, die bei jeder zentrifugierten Vollblutspende entstehen, würde zu einer wesentlich leichteren Verfügbarkeit führen. Zudem würden für die Spender das deutlich aufwändigere Verfahren der Leukaphaerese mit vorhergehender Stimulation der Granulozytopoese durch G-CSF und/oder Kortikosteroide sowie die Gefahr allergischer Reaktionen auf den Sedimentationsbeschleuniger HES wegfallen.

Bezüglich der Lagerung von Granulozytenkonzentraten gibt es aktuell nur wenige Veröffentlichungen. Ziel dieser Arbeit sollte es daher sein, systematisch verschiedene Lagerungsbedingungen zu vergleichen und eine Methode zu finden, Granulozyten auch bis zu 72 Stunden ohne größere Funktionseinbußen aufbewahren zu können und damit eine bessere Verfügbarkeit zu erreichen. Ein Problem der Lagerung ist sicher, dass es sich bei den Granulozytenkonzentraten um Zellgemische handelt, bei denen die verschiedenen Zellen und sonstigen Bestandteile jeweils unterschiedliche Lagerungsbedingungen benötigen. Demensprechend ist vor der Lagerung eine Verminderung der Nicht-Leukozyten sinnvoll, um die Lagerungsbedingungen gezielt auf die Leukozyten ausrichten zu können.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Geräte**

Tab.3: für die Versuche verwendete Geräte.

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Absauggerät Laboport	KNF Neuberger, Freiburg
Blutgasanalysegerät, ABL 77 SCi	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Cobas Mira	Roche, Mannheim
FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Luminoskan Ascent RS Typ 391	Labsystems Thermo Scientific, Karlsruhe
Magnetplatte MR 3001	Heidolph, Schwabbach
Mikroskop Wilovert 30	Hund, Wetzlar
Pipetten Acura 825	Socorex, Ecublens, Schweiz
Sterilwerkbank, Hera Safe	Thermo Scientific, Karlsruhe
Stoppuhr SKT338N	Oregon Scientific, Buckinghamshire, GB
Sysmex KX-21N	Sysmex Corporation, Norderstedt
Vortex-Mischer V1 -1 plus	Biosan, Riga, Lettland
Wasserbad Typ 1002	GFL, Burgwedel
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen	Eppendorf, Hamburg

### 3.2 Materialien

Tab. 4: für die Versuche verwendete Materialien.

Beschreibung	Hersteller
60ml-Perfusorspritze	Beckton, Dickinson and Company, Heidelberg
96-well-Platte, weiß	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Buffy Coat	Transfusionsmedizin Rostock
Blutgruppengleiches Citratplasma	Transfusionsmedizin Rostock
Blutgruppengleiches CPD-Plasma	Transfusionsmedizin Rostock
CaMg-Lösung	Orpegen, Heidelberg
Citrat-Puffer	Sigma-Aldrich, Seelze
Cord blood collection and T&B volume reduction bag, 200 ml MDT1200PU	Macopharma, Langen
Dexa 4mg/ml inject	Jenapharm, Jena
DHR 123 / invitrogen (1:10 mit PBS)	Orpegen, Heidelberg
Essigsäurelösung 1%tig (10ml in 990ml NaCl-Lösung)	Sigma-Aldrich, Seelze Braun, Melsungen
HAES 200 Infukoll	Fresenius Kabi, Homburg
Heparin-Natrium-5000 / (5000 I.E./0,2ml)	Ratiopharm, Ulm
HEPES	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
KCl-Lösung 7,5%	Braun, Melsungen
Lucigenin (6,5 mM in 0,9% NaCl-Lösung)	Sigma-Aldrich, Seelze
Luminol (100 mM in DMSO)	Sigma-Aldrich, Seelze
NaCl-Lösung 0,9%	Braun, Melsungen
PBS Without Ca & Mg	PAA Laboratories, Dulbecco's
Schlauch	Gambro, Rostock
T75 Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Beschreibung	Hersteller
Testkit Phagotest Testkit Bursttest <ul style="list-style-type: none"> <li>• Waschlösung</li> <li>• Quenching Reagenz</li> <li>• Lysinglösung (1:10 mit Aqua steril)</li> <li>• DNA</li> <li>• FITC E. coli</li> <li>• E. coli</li> </ul>	Orpegen, Heidelberg
Trypanblau 0,4%	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Zählkammer, NEUBAUER improved, DHC – No1	Peqlab, Erlangen
Zentrifugenröhrchen 15 und 50ml	Sarstedt, Nürnberg
Zymosan A (15 mg/ml in PBS/Sigma Arbeitslösung: 5 mg/ml PBS)	Sigma-Aldrich, Seelze

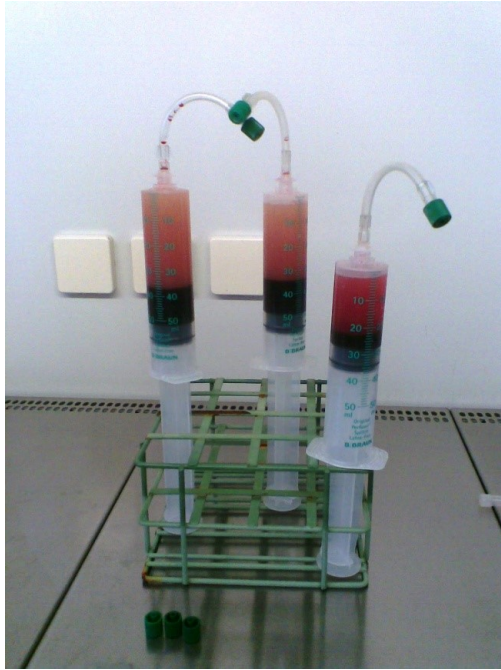
### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Aufreinigung der Buffy Coats

Zur Aufreinigung wurde ein modifiziertes Verfahren von A. Lübcke (Arbeitsgruppe) angewendet. Unter der Sterilwerkbank wurden 60ml-Perfusorspritzen folgendermaßen mit Buffy Coat und HES 200, zur Beschleunigung der Erythrozyten-Sedimentation, aufgezogen:

1. BC und HES wurden im Verhältnis 1:1 gemischt (n=7).
2. BC und HES wurden im Verhältnis 2:1 gemischt (n=8).
3. BC und HES wurden im Verhältnis 2:1 gemischt und der entleerte BC Beutel wurde mit der entsprechenden Menge HES ausgespült (n=8).

An die Spritzen wurden verschlossene Schläuche geschraubt und die gesamte Konstruktion wurde für einige Sekunden vorsichtig geschwenkt und anschließend auf die Kolben gestellt. Nach gut sichtbarer Sedimentation (ca. nach 40 Minuten) wurden die Überstände über die Schläuche in sterile Zentrifugenröhrchen gefüllt. Die sedimentierten Erythrozyten wurden verworfen.



**Abb. 3: Sedimentation nach 40 Minuten.**



**Abb. 4: Überstände in Zentrifugenröhrchen.**

Danach wurden die Zentrifugenröhrchen für 7 Minuten bei 200g und 21°C zentrifugiert und die Überstände abgesaugt und verworfen. Um Thrombozyten zu entfernen, wurde das Sediment zwei mal mit NaCl-Lösung ausgewaschen. Dabei wurden die Zellpellets nach dem Absaugen in 40ml physiologischer NaCl-Lösung resuspendiert, wieder bei 200g und 21°C für 7 Minuten zentrifugiert und die Überstände verworfen. Nach den Waschungen wurden die zwei entstandenen Zellpellets in jeweils ca. 5ml blutgruppengleichem Plasma resuspendiert und gepoolt. Das verwendete Plasma wurde zuvor, zum Entfernen von Kryopräzipitaten, direkt nach dem Auftauen, 10 Minuten bei 4°C und 3200g zentrifugiert. Nur der Überstand wurde zum Lösen und zur Lagerung der Zellen verwendet. Nach automatischer Bestimmung der Konzentration weißer Blutzellen mit Hilfe des Sysmex, wurden die Leukozyten entsprechend der angestrebten Konzentration im Lagermedium verdünnt und auf ihre Lagerbehältnisse verteilt.

### 3.3.2 Lagerung

Die Leukozytenkonzentrate wurden über 72 Stunden in ihrem entsprechenden Behältnis und Medium gelagert. Alle 24 Stunden wurden die zur Lagerung verwendeten Zellkulturflaschen oder Kunststoffbeutel durch schwenkende Bewegungen vorsichtig durchmischt, um die Leukozyten von den Wänden zu lösen. Die Zellkulturflaschen wiesen dabei eine luftdurchlässige Filterkappe auf. Zwei bis drei Milliliter der Zellsuspensionen wurden jeweils entnommen, um die folgenden Untersuchungen durchzuführen:

- Erstellen eines Differentialblutbildes mit Hilfe des Sysmex
- Vitalitätsbestimmung mit Hilfe des Trypanblau-Tests unter dem Lichtmikroskop
- Bestimmung der Chemilumineszenz
- Bestimmung des pH-Wertes/ Durchführung einer Blutgasanalyse
- Durchflusszytometrische Bestimmung von Phagozytose und Oxyburst mit Hilfe des FACS Calibur
- Bestimmung von Lactat, Glucose und der Aktivität der LDH durch den Cobas Mira
- Fixierung für die Betrachtung unter dem Elektronenmikroskop



Abb. 5: Lagerung in Zellkulturflaschen.



Abb. 6: Beutellagerung bei 4°C.

In der folgenden Tabelle sind die verschiedenen Versuchsreihen dargestellt und unter welchen Bedingungen die Leukozytenkonzentrate gelagert wurden. Jede Reihe bestand aus drei gleich ablaufenden Versuchen. Die geänderten Bedingungen sind jeweils fett markiert.

Tab. 5: Versuchsreihen.

Versuchsreihe/ Behältnis	Lagermedium	Temperatur	Konzentration	Tests
1.) Zellkulturflaschen mit luftdurchlässiger Kappe	20 ml blutgruppengleiches Citrat- oder CPD- Plasma	4°C, RT, 37°C (CO2- Inkubator)	<b>2,5x10<sup>6</sup>/ml</b>	Sysmex Trypanblau Chemi
2.) Zellkulturflaschen mit luftdurchlässiger Kappe	20 ml blutgruppengleiches Citrat- oder CPD- Plasma	4°C, RT, 37°C (CO2- Inkubator)	<b>5x10<sup>6</sup>/ml</b>	Sysmex Trypanblau Chemi
3.) <b>Kunststoffbeutel</b> mit niedriger Gaspermeabilität	<b>40 ml</b> blutgruppengleiches Citrat- oder CPD- Plasma	4°C, RT, 37°C (CO2- Inkubator)	5x10 <sup>6</sup> /ml	Sysmex Trypanblau Chemi pH-Wert
4.) Kunststoffbeutel mit niedriger Gaspermeabilität	40 ml blutgruppengleiches Citrat- oder CPD- Plasma und <b>Zitronensäure → pH 7,2</b>	4°C, RT, <b>37°C (Wasserbad)</b>	5x10 <sup>6</sup> /ml	Sysmex Trypanblau Chemi pH-Wert
5.) Kunststoffbeutel mit niedriger Gaspermeabilität	40 ml blutgruppengleiches Citrat- oder CPD- Plasma und Citrat- Pufferlösung → pH 7,17 mit <b>HEPES</b>	4°C, RT	5x10 <sup>6</sup> /ml	Sysmex Trypanblau Chemi FACS BGA
6.) Kunststoffbeutel mit niedriger Gaspermeabilität	40 ml <b>Citratplasma</b> , Citrat-Pufferlösung und <b>KCl</b> → pH 7,24 - 7,3	4°C, RT	5x10 <sup>6</sup> /ml	Sysmex Trypanblau Chemi FACS BGA Cobas mira
7.) Kunststoffbeutel mit niedriger Gaspermeabilität	40 ml <b>CPD-Plasma</b> , Citrat-Pufferlösung und <b>KCl</b> → pH 7,24 - 7,3	4°C, RT	5x10 <sup>6</sup> /ml	Sysmex Trypanblau Chemi FACS BGA Cobas mira
8.) Kunststoffbeutel mit niedriger Gaspermeabilität	40 ml CPD-Plasma mit Citrat- Pufferlösung und <b>KCl</b> <b>mit und ohne</b> <b>Dexamethason</b> (1x10 <sup>-5</sup> mol/l)	RT	<b>2x10<sup>7</sup>/ml</b> <b>gepoolte</b> <b>Zellen</b>	Sysmex Trypanblau Chemi FACS BGA Cobas mira Elektronen- mikroskopie

Die ersten Versuche wurden in T75-Zellkulturflaschen mit luftdurchlässiger Filterkappe durchgeführt. In allen späteren Versuchen wurden wenig gasdurchlässige Kunststoffbeutel von Macopharma verwendet. Es handelte sich um sterile Beutel mit einem Volumen von ca. 150 ml aus einem System zur Blutgewinnung und Volumenreduktion. Das System bestand insgesamt aus drei Beuteln die über Schläuche miteinander verbunden waren. Der Schlauch wurde zum Auffüllen der Beutel und zur Entnahme der Proben alle 24 Stunden verwendet. Zwischen diesen Zeiten wurde er mit einer Klemme verschlossen. Siehe auch Abbildung 5. Zur Verdünnung der Leukozyten wurde Blutgruppengleiches Citrat- oder CPD-Plasma in Form von gefrorenem Frischplasma verwendet. Die Gewinnung der Plasmen kann jeweils sowohl durch Zentrifugation und Abpressen einer Vollblutspende, als auch durch Apherese erfolgen (74). Citrat und CPD-Plasma unterschieden sich in ihren Zusätzen. Um Citratplasma zu gewinnen wird dem Blut vor der Zentrifugation in der Regel Natriumcitrat hinzugefügt, dass durch Komplexbildung mit Kalziumionen zur Gerinnungshemmung führt. CPD-Plasma enthält zusätzlich Phosphat und Dextrose (42).

### **3.3.3 Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellzahl von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten, sowie der einzelnen Leukozytenfraktionen (Neutrophile, Lymphozyten, Monozyten) wurde mit Hilfe des Zellzählgerätes Sysmex KX-21N bestimmt. Ein Blutbild wurde jeweils aus dem Buffy Coat, dem fertigen Leukozytenkonzentrat vor und nach dem Verteilen auf die Lagermedien und aus jedem einzelmem Leukozytenkonzentrat alle 24 Stunden erstellt.

### **3.3.4 Vitalitätsbestimmung**

Die Vitalität der Zellen wurde mit Hilfe des Trypanblautestes ermittelt. Zuerst wurden 50µl Zellsuspension mit 50µl Trypanblau gemischt und ein bis zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden zur Lyse der roten Blutkörperchen und zum Verdünnen 400µl Essigsäure (1%) hinzugegeben und das Gemisch noch eine Minute inkubiert. Mit einer Pipette wurde die Lösung in eine Neubauer Zählkammer gegeben und die Leukozyten in 2 - 4 der großen Kästchen ausgezählt. Zellen die den blauen Farbstoff nicht angenommen hatten wurden als vital gewertet, Zellen mit blauem Zytoplasma als avital.

### 3.3.5 pH - Wert

Die Blutgasanalyse ist ein Verfahren zur Messung der Partialdrücke von Sauerstoff, Kohlendioxid sowie des pH-Wertes und des Säure-Basen-Haushaltes im Blut. Ab der dritten Versuchsreihe wurde jeweils nach der Aufreinigung und alle 24 Stunden der pH-Wert bestimmt. Zudem wurde in einigen Versuchen mittels Blutgasanalyse der pH-Wert und der Kaliumspiegel durch Zugabe von Citronensäure und Kaliumchlorid modifiziert.

### 3.3.6 Chemilumineszenz

Die Intensität der Chemilumineszenz wurde jeweils direkt nach Aufreinigung und dann über 72 Stunden alle 24 Stunden bestimmt. Dazu wurden Lucigenin und Luminol zum Nachweis von Wasserstoffperoxid und Hydroxidionen (reaktive Sauerstoffspezies) verwendet. Lucigenin und Luminol wirken als chemische Signalverstärker. Durch die Verbindung mit reaktiven Sauerstoffspezies kommt es zur Abgabe von Photonen (79), die mit dem Luminometer gemessen werden können. Die Intensität der Lumineszenz ist dabei proportional zur Anzahl der Reaktionen (80). Zymosan diente zur Stimulierung der Leukozyten. Mit Hilfe des Blutbildes wurde die Menge Zellsuspension berechnet und entnommen, welche  $1 \times 10^7$  Leukozyten enthielt. Die Zellen wurden zentrifugiert, in Plasma resuspendiert, auf 2 ml Lösung aufgefüllt und nach folgendem Schema in eine 96-Well-Platte pipettiert:

1. Zellsuspensionen (Leukozytenkonzentrat = LK)
2. Lucigenin, Luminol
3. PBS
4. Zymosan

Die Lucigenin Stammlösung wurde im Verhältnis 1+9 mit PBS verdünnt, Luminol im Verhältnis 1+99.

Tab. 6: Pipettierschema Chemilumineszenz, modifiziert nach A. Lübcke.

100µl Zellsuspension 50µl Lucigenin 50µl <b>PBS</b>	100µl Zellsuspension 50µl Lucigenin 50µl <b>PBS</b>	100µl Zellsuspension 50µl Lucigenin 50µl <b>PBS</b>
100µl Zellsuspension 50µl Lucigenin 50µl <b>Zymosan</b>	100µl Zellsuspension 50µl Lucigenin 50µl <b>Zymosan</b>	100µl Zellsuspension 50µl Lucigenin 50µl <b>Zymosan</b>
100µl Zellsuspension 50µl Luminol 50µl <b>PBS</b>	100µl Zellsuspension 50µl Luminol 50µl <b>PBS</b>	100µl Zellsuspension 50µl Luminol 50µl <b>PBS</b>
100µl Zellsuspension 50µl Luminol 50µl <b>Zymosan</b>	100µl Zellsuspension 50µl Luminol 50µl <b>Zymosan</b>	100µl Zellsuspension 50µl Luminol 50µl <b>Zymosan</b>

Messung:

Grundeinstellungen für Luminoskan Ascent RS:

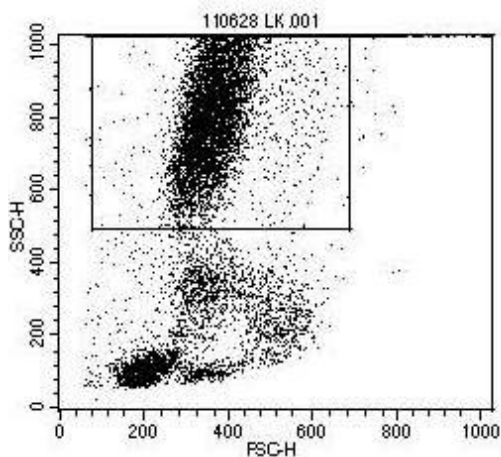
Startup-Temperatur:	37°C
Inkubationstemperatur:	37°C
Messreihenfolge:	entsprechend der Reihenfolge der Zymosanzugabe
Messvariante:	Kinetik
Empfindlichkeit:	hoch
Integrationszeit:	1sec
Messintervall:	2min
Anzahl Messungen:	30

Zur Auswertung wurden mit Hilfe von Excel (Microsoft, 2007) die jeweils 30 Mittelwerte der drei zusammengehörigen Messungen gebildet und addiert (entspricht der area under curve). Somit ergaben sich aus der ersten und dritten Reihe die Negativkontrollen für Lucigenin und Luminol und aus der zweiten und vierten Reihe die Höhe des durch Zymosan stimulierten Oxybursts in relativen Chemilumineszenzunits. Die addierten Werte der Negativkontrollen wurden jeweils von den addierten Werten der Positivkontrollen abgezogen.

### 3.3.7 Bestimmung von Phagozytose und Oxyburst im Durchflusszytometer

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es Zellen oder andere Partikel in einer Flüssigkeit hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenzintensität zu unterscheiden. Durch einen Laserstrahl (488nm), der auf die Zellen trifft und an ihnen gestreut wird, entsteht das

sogenannte Vorwärtsstreulicht (Forward scatter channel) und das Seitwärtsstreulicht (Side scatter channel). Während das Vorwärtsstreulicht Aussagen über die Zellgröße ermöglicht, kann das Seitwärtsstreulicht als Maß für die Granularität angesehen werden. Die Emission von Fluoreszenzlicht kann durch einen Laserstrahl anderer Wellenlänge ausgelöst werden, beispielsweise 530 nm für FITC (Fluorescein Isothicyanat) markierte E. coli Bakterien. Dargestellt werden die Zellen in Dotplot-Diagrammen, als Punkte mit entsprechenden Eigenschaften. Bestimmte Zellpopulationen, in diesem Fall die Granulozyten können durch „Gates“ von anderen Zellgruppen abgegrenzt werden.



**Abb. 7:** Darstellung eines aufgereinigten Leukozytenkonzentrates (LK) nach durchflusszytometrischer Messung in einem Dotplot-Diagramm. Die umrandeten Zellen entsprechen den Granulozyten. SSCH = Side scatter channel, FSCH = Forward scatter channel.

Mit Hilfe des Durchflusszytometers (Facs Calibur BD) und den beiden Testkits Phagotest und Bursttest von Orpegen konnte sowohl der Anteil der Zellen bestimmt werden, die E. coli Bakterien phagozytierten, beziehungsweise durch Kontakt mit diesen reaktive Sauerstoffspezies ausschütteten, als auch die Intensität, mit der sie dies taten. Dabei dienen FITC markierte E. coli Bakterien zum Nachweis der Phagozytose und Dihydrorhodamin 123 (DHR 123) zur Identifizierung reaktiver Sauerstoffspezies. Diese Messungen wurden zusätzlich zur Bestimmung der Chemilumineszenz ab der 5. Versuchsreihe auch an den Buffy Coats durchgeführt und jeweils direkt nach Aufreinigung und dann über 72 Stunden alle 24 Stunden. Mit Hilfe des Blutbildes wurde die Menge Zellsuspension berechnet und entnommen, die  $1 \times 10^7$  Leukozyten enthielt. Die Zellen wurden zentrifugiert, in Plasma resuspendiert und auf 2ml Lösung aufgefüllt. Davon wurden 600µl entnommen mit 12 µl Heparin-Lösung (1:20 verdünnt: 10µl Heparin 5000 I.E./ 0,2 ml + 190 µl 0,9%ige NaCl-Lösung => Zellsuspension mit 25 I.E. Heparin /ml Probe) vermischt und nach folgendem Schema pipettiert:

Tab. 7: Pipettierschema Durchflusszytometrie, modifiziert nach A. Lübecke.

<b>Röhrchen 1</b> (negative Kontrolle, ohne DHR, ohne E. coli)	<b>Röhrchen 2</b> (negative Kontrolle, auf Eis mit FITC E. coli)	<b>Röhrchen 3</b> (positiver Ansatz mit FITC E. coli)	<b>Röhrchen 4</b> (negative Kontrolle, mit DHR ohne E. coli)	<b>Röhrchen 5</b> (positiver Ansatz mit DHR und E. coli)
100 µl heparinisierte Zellsuspension einpipettieren				
20 µl PBS - vortexen			20 µl PBS - vortexen	
	20 µl CaMg50 Lösung - vortexen			
			5 µl DHR - vortexen	
Inkubation 5 min, RT, dunkel	Inkubation 5 min auf EIS, dunkel	Inkubation 5 min, RT, dunkel		
	20 µl eiskalte FITC markierte E.coli - vortexen			20 µl eiskalte E.coli -vortexen
Inkubation 2x10 min, 37°C, nach 10 min vortexen	Inkubation 2x10 min, auf EIS, nach 10 min vortexen	Inkubation 2x10 min, 37°C Wasserbad, nach 10 min vortexen		
100 µl eiskalte Quenchinglösung				
2x Waschen: 2 ml eiskalte EDTA-PBS 0,4% Lösung – vortexen - zentrifugieren: 4°C, 5 min, 300g - Überstand absaugen				
Pellet lysieren: 2ml Lysing Lösung – vortexen - Inkubation 20 min, RT, dunkel				
Zentrifugation: 5 min, 300g, 4°C - Überstand absaugen				
2 ml Waschlösung – vortexen - Zentrifugation: 5 min, 300g, 4°C - Überstand absaugen				
200 µl DNA Färbelösung – vortexen - Inkubation 10 min auf EIS				
200 µl PBS Lösung				
Messung am FACS Calibur				

Zur Auswertung wurde CELLQuest Software verwendet.

### **3.3.8 Bestimmung von Glucose, Lactat und LDH**

Der Cobas Mira ist ein Analysegerät zur Bestimmung von Elektrolyten, Enzymen, Substraten und spezifischen Proteinen im Blutplasma. Ab der 6. Versuchsreihe wurden im Plasma, im Buffy Coat, im LK und in den Ansätzen alle 24 Stunden über 72 Stunden Glucose, Lactat und die Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) bestimmt.

### **3.3.9 Elektronenmikroskopie**

Für die 8. Versuchsreihe wurden während eines Durchganges elektronenmikroskopische Bilder jeweils aus den Buffy Coats, dem aufgereinigten Leukozytenkonzentrat und dann jeweils alle 24 Stunden aus den Ansätzen angefertigt.

### **3.3.10 Statistische Analyse**

Die deskriptive Statistik erfolgte zunächst mit Hilfe von Excel (Microsoft Office 2007, Seattle, USA). Das Programm wurde zur Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen und zum Erstellen der Diagramme benutzt. Mit Hilfe des statistischen Softwarepaketes (Statistical Package for Social Sciences [SPSS Inc., Chicago, USA] Version 20) erfolgte die analytische Auswertung in Form der univariaten einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) aller Werte einer Untersuchungsmethode zu einem bestimmten Zeitpunkt. Bei signifikantem F-Test wurde der Fisher/LSD-Test (Least Significant Difference) durchgeführt. P-Werte kleiner als 0,05 wurden dabei als signifikant, p-Werte kleiner 0,01 als hochsignifikant gewertet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Aufreinigung der Buffy Coats

Insgesamt wurden im Rahmen aller Versuche 23 Buffy Coats unter verschiedenen Bedingungen aufgereinigt. Das Ausgangsvolumen lag zwischen 50ml und 75ml. Die folgende Tabelle soll verdeutlichen, wie hoch im Buffy Coat der Anteil der Erythrozyten und Thrombozyten im Verhältnis zu dem der Leukozyten lag und wie stark sich diese zwei Fraktionen jeweils durch die Aufreinigung reduzierten. Die Zellzahl wurde hierbei jeweils auf das Volumen der Buffy Coats hochgerechnet, ist also absolut.

**Tab. 8: Zellzahlen  $\times 10^9$  von Leukozyten (WBC), Thrombozyten (PLT) und Erythrozyten (RBC) im Buffy Coat (BC) und nach drei verschiedenen Arten der Aufreinigung (BC und HES im Verhältnis 1:1 [1:1], BC und HES im Verhältnis 2:1 [2:1] und BC und HES im Verhältnis 2:1 inklusive Ausspülen des Buffy Coat-Beutels mit HES [2:1+]) im Leukozytenkonzentrat (LK). n = 7/8/8.**

	<b>BC</b>	<b>BC</b>	<b>BC</b>	<b>LK</b>	<b>LK</b>	<b>LK</b>
<b>Aufreinigung</b>	<b>WBC</b>	<b>PLT</b>	<b>RBC</b>	<b>WBC</b>	<b>PLT</b>	<b>RBC</b>
<b>1:1</b>	1,4 +/-0,3	242,7 +/-36,3	104,8 +/-14,4	0,6 +/-0,1	3,5 +/- 0,2	1,5 +/- 0,1
<b>2:1</b>	1,6 +/-0,4	219,2 +/-42,1	81,0 +/-17,6	0,8 +/-0,1	2,9 +/-0,3	1,2 +/-0,9
<b>2:1+</b>	2,0 +/-0,7	242,0 +/-36,5	75,8 +/-21,4	1,0 +/-0,2	3,5 +/-0,3	1,1 +/-1,2

Durch die Aufreinigung reduzierten sich die Erythrozyten durchgehend um über 99%, die Thrombozyten um 94-95%. Aber auch bei den Leukozyten kam es zu Verlusten um ca. 50%. Bei der Aufreinigung im BC:HES Verhältnis 2:1 und anschließendem Spülen des Beutels, blieben die meisten Leukozyten erhalten, knapp 50%. Die Reduktion roter Blutzellen war bei der Aufreinigung 2:1+ signifikant höher als bei 1:1. Die untenstehende Abbildung zeigt noch einmal bildlich wie sich die Verhältnisse der 3 Zellpopulationen im Buffy Coat und im aufgereinigten Leukozytenkonzentrat darstellten.

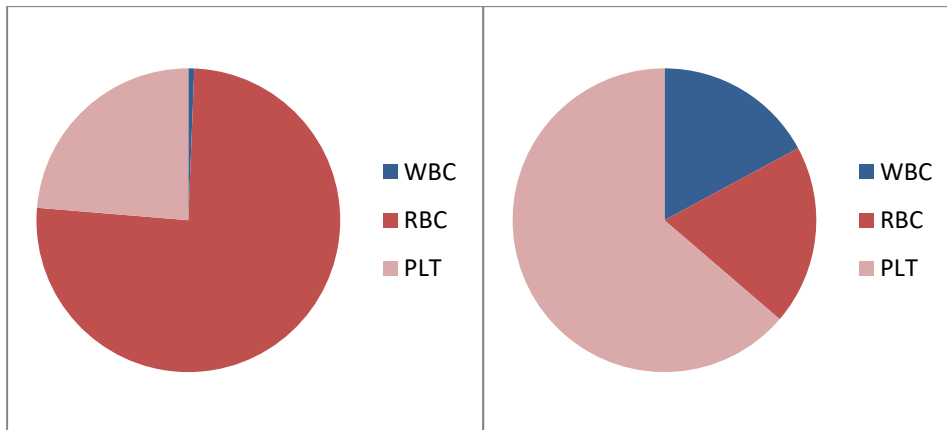


Abb. 8: durchschnittlicher Anteil von Plättchen (PLT) roten (RBC) und weißen (WBC) Blutzellen im Buffy Coat und nach Aufreinigung im Buffy Coat:HES Verhältnis 2:1 inklusive Spülen des Buffy Coat-Beutels, n=8.

### Differentialblutbild - Leukozyten

In diesem Diagramm wird veranschaulicht, inwieweit sich die drei Leukozyten-Untergruppen durch die Aufreinigung absolut veränderten.

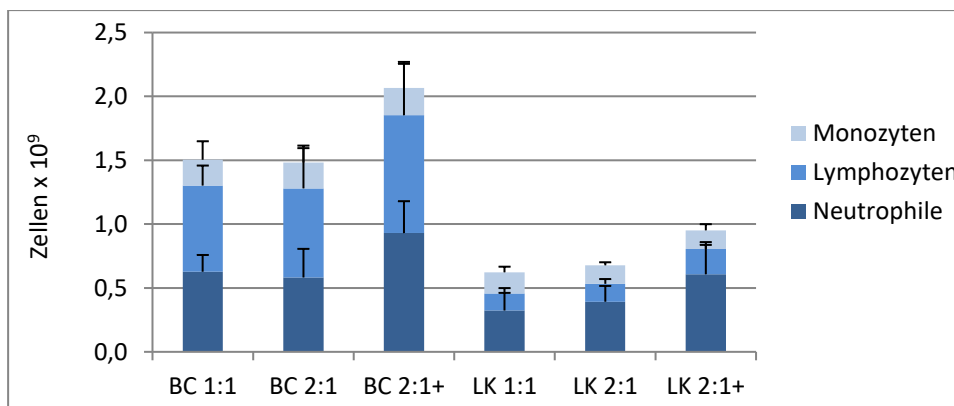


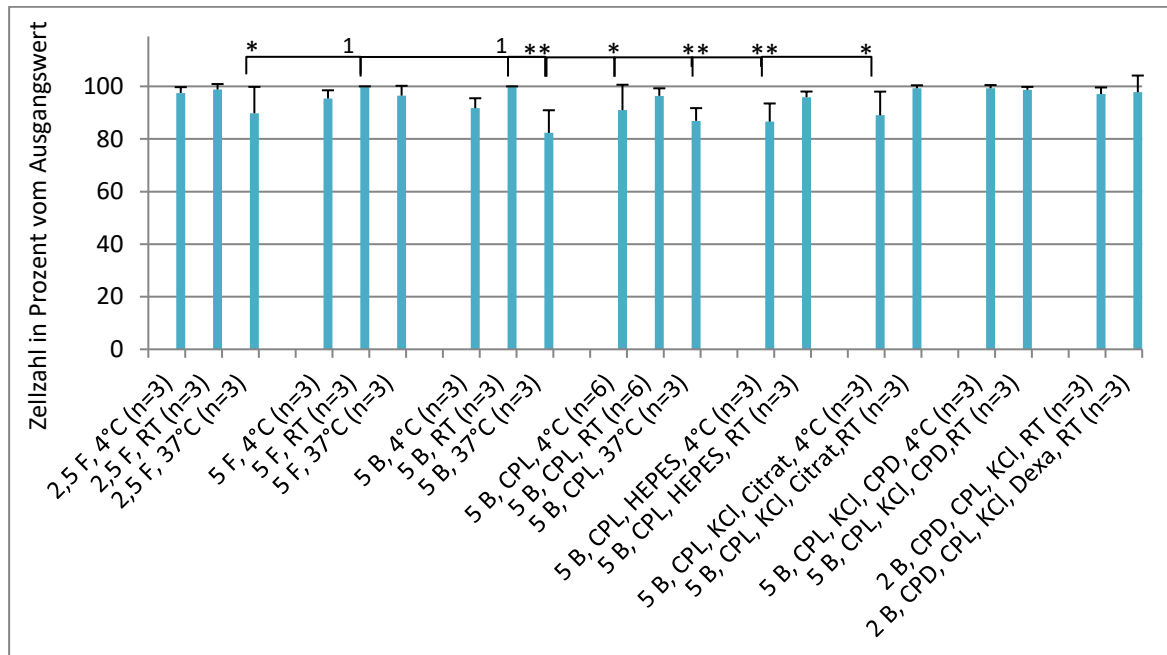
Abb. 9: Reduktion der absoluten Zellzahl von Monozyten, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten bei drei verschiedenen Arten der Aufreinigung, (Buffy Coat [BC] und HES im Verhältnis 1:1 [1:1], BC und HES im Verhältnis 2:1[2:1] und BC und HES im Verhältnis 2:1 inklusive Ausspülen des Buffy Coat – Beutels mit HES [2:1+]). n = 7/8/8.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten in den Buffy Coats ungefähr jeweils 40-45 Prozent der Zellen ausmachten. Die Menge der Monozyten entsprach jeweils nur 5-10 Prozent. Zu den stärksten Verlusten durch die Aufreinigung, kam es bei den Lymphozyten. Bei allen drei Arten der Aufreinigung reduzierte sich die Anzahl der Lymphozyten um ungefähr 80%. Bei den Monozyten kam es zu einer hohen Schwankungsbreite. Teilweise lag die errechnete Anzahl der Monozyten nach der Aufreinigung doppelt so hoch wie davor. Die Neutrophilen Granulozyten

reduzierten sich bei der 1:1 Aufreinigung um 44%, bei der 2:1 Aufreinigung mit und ohne ausspülen des Buffy Coat Beutels nur um durchschnittlich 32% und 31%. Insgesamt erwies sich die Aufreinigung im BC:HES-Verhältnis von 2:1 am günstigsten in Hinblick auf die Reduktion von Erythrozyten und Thrombozyten. Im Durchschnitt kam es bei dieser Methode auch zu einem geringeren Verlust an Leukozyten. Das Ausspülen des Buffy-Coat-Beutels zeigte nur minimale, nicht signifikante Vorteile in Bezug auf die Bewahrung von Leukozyten. Die Leukozytenkonzentrate bestanden bei der effektivsten untersuchten Form der Aufreinigung trotzdem noch zum größten Teil aus Thrombozyten (64%) und zu etwa gleich großen Teilen aus Erythrozyten (19%) und Leukozyten (17%). Die Reduktion der Gesamtleukozyten lag bei 50 %, die der Neutrophilen Granulozyten bei 32 %. Durchschnittlich konnten je Buffy Coat  $0,95 \times 10^9$  Leukozyten gewonnen werden, davon  $0,61 \times 10^9$  Neutrophile Granulozyten.

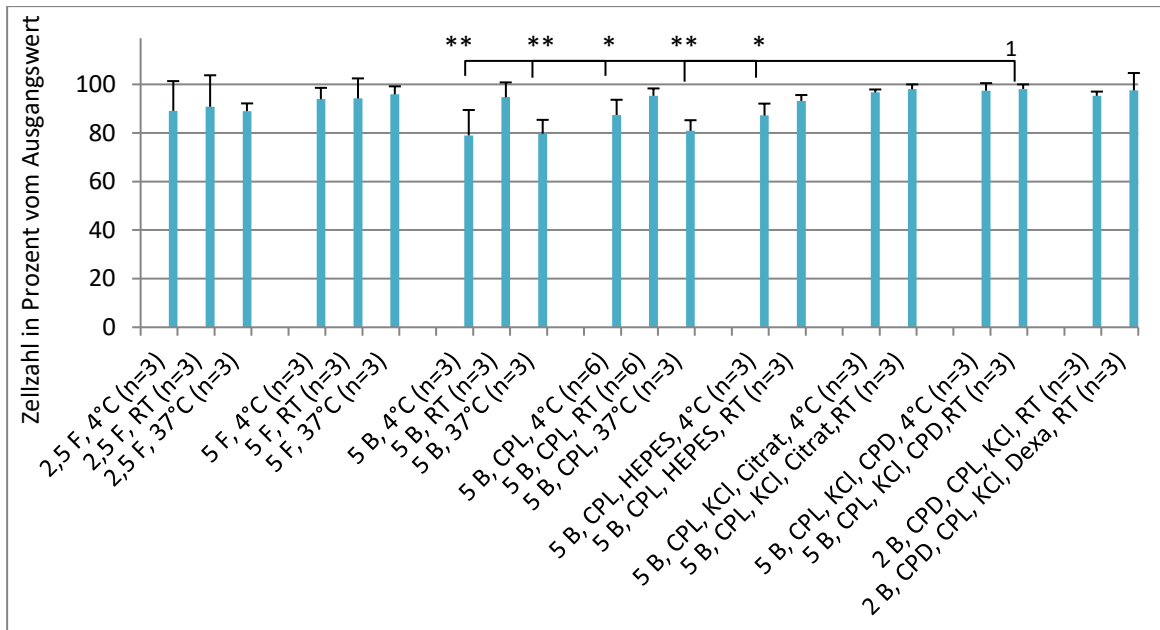
## 4.2 Entwicklung der Zellzahl über 72 Stunden

Nach 24 Stunden lag die Zellzahl unter allen Lagerungsbedingungen noch bei über 80% des Ausgangswertes. Wobei die bei 37° C gelagerten Zellen in der 1., 3. und 4. Versuchsreihe und die bei 4 °C gelagerten Zellen der 4., 5. Und 6. Versuchreihe signifikant schlechter abschnitten, als die bei Raumtemperatur gelagerten Zellen der 2. und 3. Versuchreihe, die die besten Ergebnisse erzielten.



**Abb. 10: Zellzahl in Prozent vom Ausgangswert (Leukozytenkonzentrat) nach 24 Stunden**  
**Abkürzungen:** 2,5:Konzentration weißer Blutzellen von  $2,5 \times 10^6$ /ml, 5: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, 2: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, F: Lagerung in einer Zellkulturflasche, B: Lagerung im Beutel, RT: Raumtemperatur, CPL: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), KCl: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), Citrat: Lagerung der Zellen in Citratplasma, CPD: Lagerung in CPD-Plasma, Dexa: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l) | 1: Gruppe mit bestem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

Auch nach 48 Stunden Lagerung blieb die durchschnittliche Zellzahl in allen Ansätzen relativ stabil. Die besten Werte konnten bei Lagerung in CPD-Plasma, bei Raumtemperatur erzielt werden. Signifikant schlechter schnitt die Lagerung in Beuteln, ohne Zugabe eines Citrat-Puffers (CPL) bei 4°C und 37°C ab, hier fiel die Zellzahl unter 80 Prozent des Ausgangswertes. Auch bei Zugabe eines Citratpuffers bei 4°C und Raumtemperatur und bei Lagerung mit HEPES bei 4°C waren die Zellzahlen signifikant niedriger als in der Vergleichsgruppe. Bei Lagerung im Kühlschrank kam es immer wieder zu Agglutinationen.

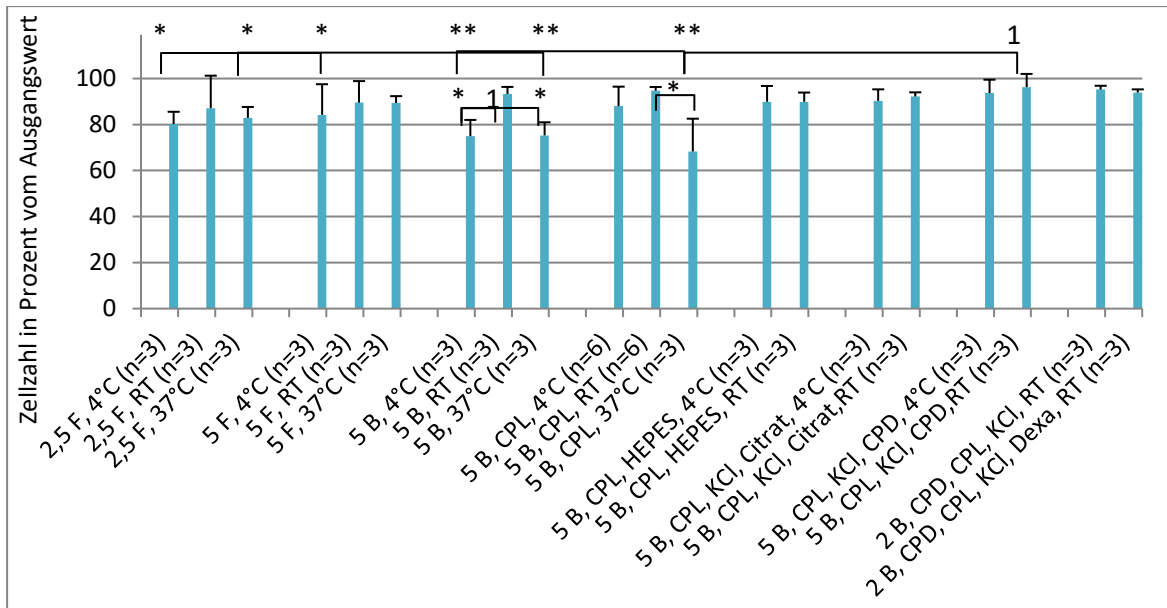


**Abb. 11: Zellzahl in Prozent vom Ausgangswert (Leukozytenkonzentrat) nach 48 Stunden**  
**Abkürzungen:** 2,5:Konzentration weißer Blutzellen von  $2,5 \times 10^6$ /ml, 5: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, 2: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, F: Lagerung in einer Zellkulturflasche, B: Lagerung im Beutel, RT: Raumtemperatur, CPL: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), KCl: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), Citrat: Lagerung der Zellen in Citratplasma, CPD: Lagerung in CPD-Plasma, Dexa: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l) 1: Gruppe mit bestem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .



**Abb. 12: Agglutinationen bei 4°C.**

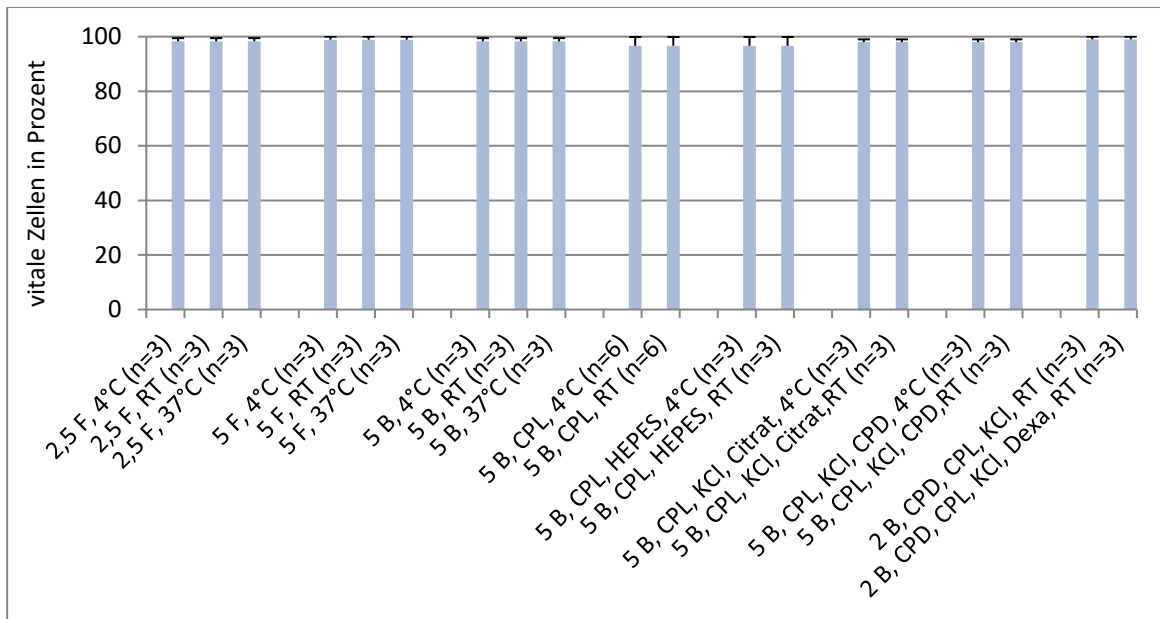
Die höchste Stabilität der Zellzahl zeigte sich auch nach 72 Stunden bei Lagerung im Beutel, in CPD-Plasma und bei Raumtemperatur mit einer Zellzahl von über 95% des Ausgangswertes.



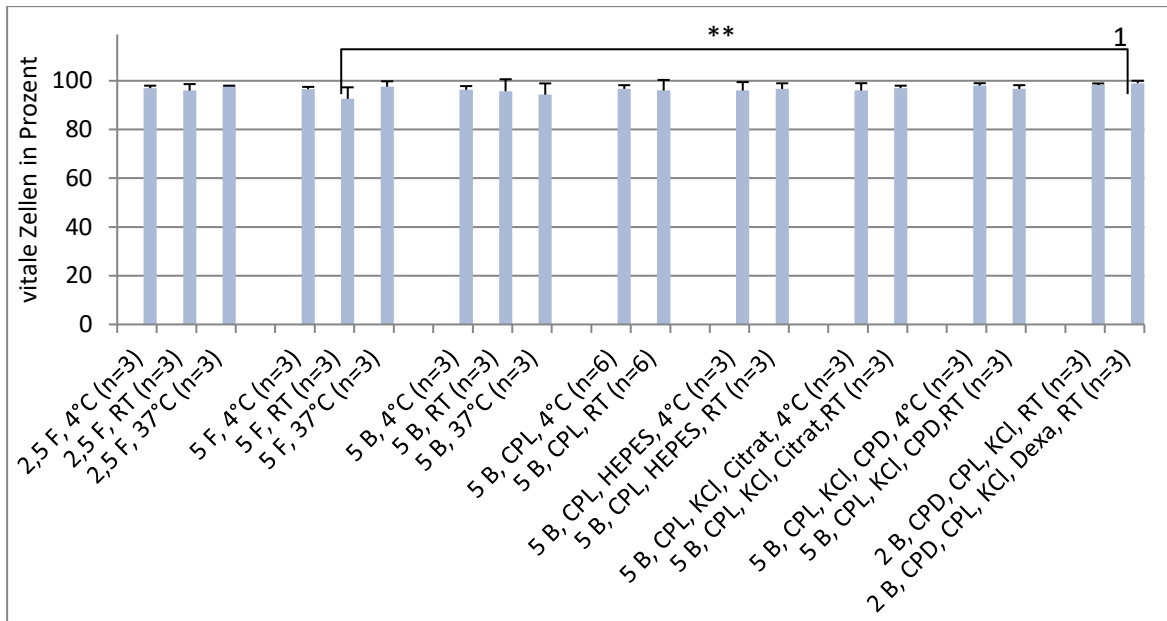
**Abb. 13: Zellzahl in Prozent vom Ausgangswert (Leukozytenkonzentrat) nach 72 Stunden**  
**Abkürzungen:** 2,5:Konzentration weißer Blutzellen von  $2,5 \times 10^6$ /ml, 5: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, 2: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, F: Lagerung in einer Zellkulturflasche, B: Lagerung im Beutel, RT: Raumtemperatur, CPL: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), KCl: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), Citrat: Lagerung der Zellen in Citratplasma, CPD: Lagerung in CPD-Plasma, Dexa: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l )1: Gruppe mit bestem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

Über 90 Prozent des Ausgangswertes erreichten ebenfalls die bei 4°C und in CPD-Plasma gelagerten Zellen der gleichen Versuchreihe, sowie beide Gruppen der hoch dosierten Zellen der 8. Versuchsreihe und die bei Raumtemperatur und in Beuteln gelagerten Zellen der 3. 4. Und 6. Versuchsreihe. Signifikant schlechtere Ergebnisse zeigten sich bei der Lagerung in Beuteln ohne Zugabe eines Puffers bei 4°C und 37°C (3. Versuchsreihe) sowie bei 37°C in der 4. Versuchsgruppe, außerdem bei Lagerung in Zellkulturflaschen bei 4°C sowohl bei höherer als auch bei niedriger Konzentration und bei 37°C in der niedrigeren Konzentration. Im direkten Vergleich zeigten sich jeweils signifikant höhere Zellzahlen für die Lagerung bei Raumtemperatur in der 3. Und 4. Versuchsreihe. Die Lagerung bei 37°C zeigte nach dem Wechsel auf luftundurchlässige Beutel und die Lagerung über einem Wasserbad anstatt im CO<sup>2</sup>-Inkubator deutlich schlechtere Ergebnisse und wurde ab der 5. Versuchsreihe nicht mehr untersucht. Da die bei 4°C-Lagerung zu beobachteten Agglutinationen als Ursache einer abnehmenden Zellzahl vermutet wurden, wurde ab der 3. Versuchsreihe das zur Lagerung verwendete Plasma nach dem Auftauen bei 4°C 10 Minuten bei 3000g zentrifugiert, um es von Kryoprecipitaten, die als Ursache der Agglutinationen vermutet wurden, zu reinigen.

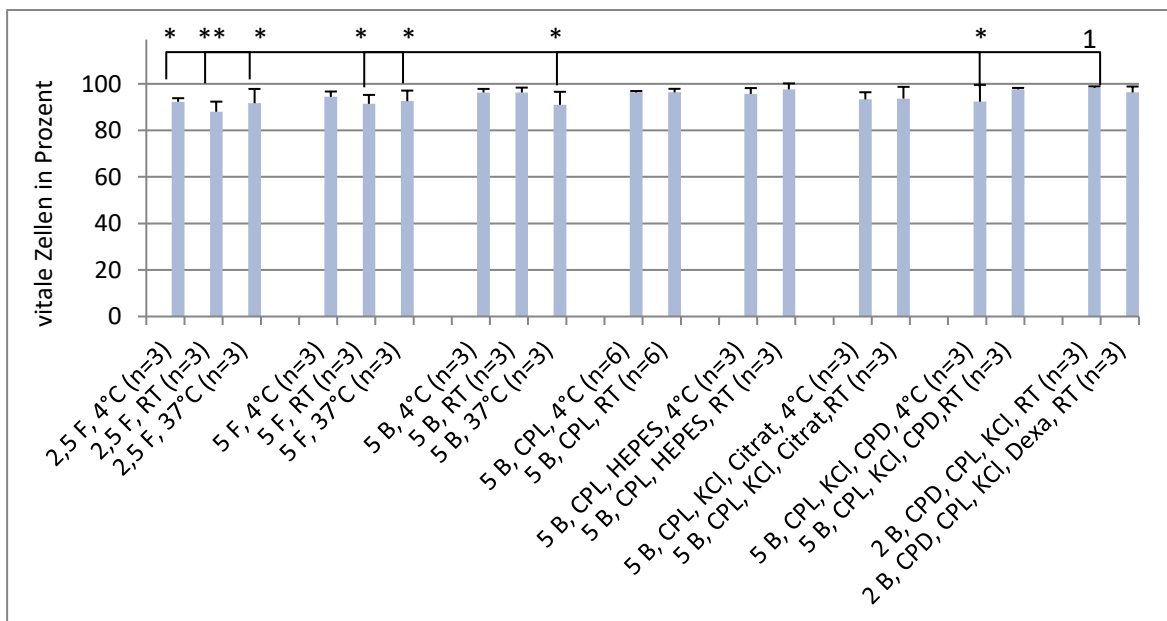
### 4.3 Vitalität über 72 Stunden



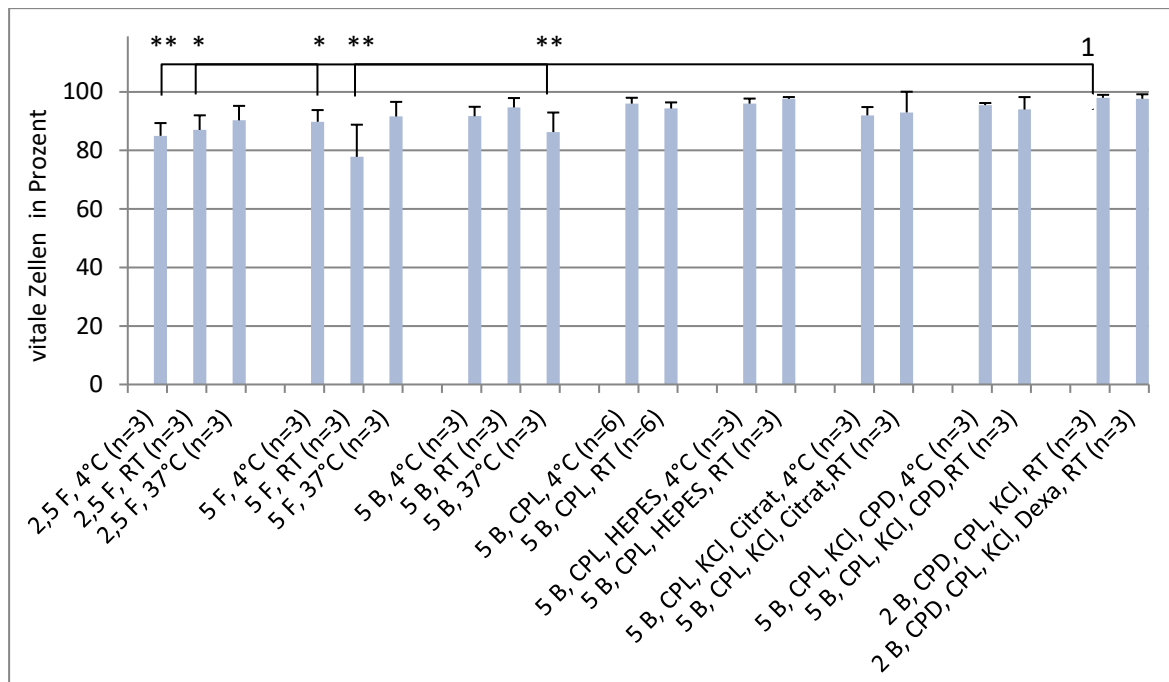
**Abb. 14: vitale Zellen in Prozent im frischen Leukozytenkonzentrat. Abkürzungen:** 2,5: Konzentration weißer Blutzellen von  $2,5 \times 10^6$ /ml, 5: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, 2: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, F: Lagerung in einer Zellkulturflasche, B: Lagerung im Beutel, RT: Raumtemperatur, CPL: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), KCl: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), Citrat: Lagerung der Zellen in Citratplasma, CPD: Lagerung in CPD-Plasma, Dexa: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l).



**Abb. 15: vitale Zellen in Prozent nach 24 Stunden.** Abkürzungen: **2,5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2,5 \times 10^6$ /ml, **5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, **2**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, **F**: Lagerung in einer Zellkulturflasche, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l ).1: Gruppe mit bestem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .



**Abb. 16: vitale Zellen in Prozent nach 48 Stunden.** Abkürzungen: **2,5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2,5 \times 10^6$ /ml, **5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, **2**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, **F**: Lagerung in einer Zellkulturflasche, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l ).1: Gruppe mit bestem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

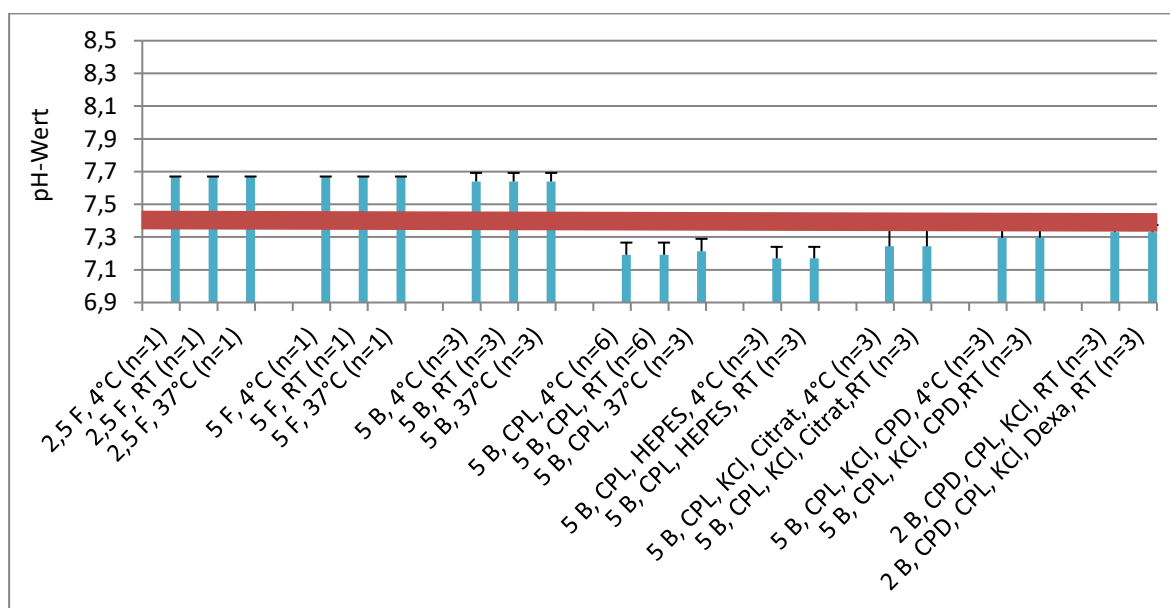


**Abb. 17: vitale Zellen in Prozent nach 72 Stunden. Abkürzungen:** **2,5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2,5 \times 10^6/\text{ml}$ , **5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6/\text{ml}$ , **2**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7/\text{ml}$ , **F**: Lagerung in einer Zellkulturflasche, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ ). **1**: Gruppe mit bestem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

Insgesamt blieb die Vitalität in fast allen Ansätzen deutlich über 80 Prozent. Nach 72 Stunden wiesen die hoch konzentrierten Zellen der 8. Versuchsreihe die höchste Vitalität (97% und 98%) auf. Signifikant schlechtere Ergebnisse erzielten die in Zellkulturflaschen gelagerten Zellen beider Konzentrationen bei 4°C und Raumtemperatur und die in Beuteln bei 37°C gelagerten Zellen der 3. Versuchsreihe. Insgesamt schnitten die in Flaschen gelagerten Zellen, außer bei 37°C schlechter als die in Beuteln aufbewahrten Zellen ab. Im direkten Vergleich erzielten die in Beuteln, bei Raumtemperatur gelagerten Zellen bei Zugabe von HEPES höhere Ergebnisse (nicht signifikant). Weiterhin lag die Vitalität der Zellen bei Lagerung in CPD-Plasma bei 4°C nach 72 Stunden höher als bei Lagerung in Citrat-Plasma (nicht signifikant).

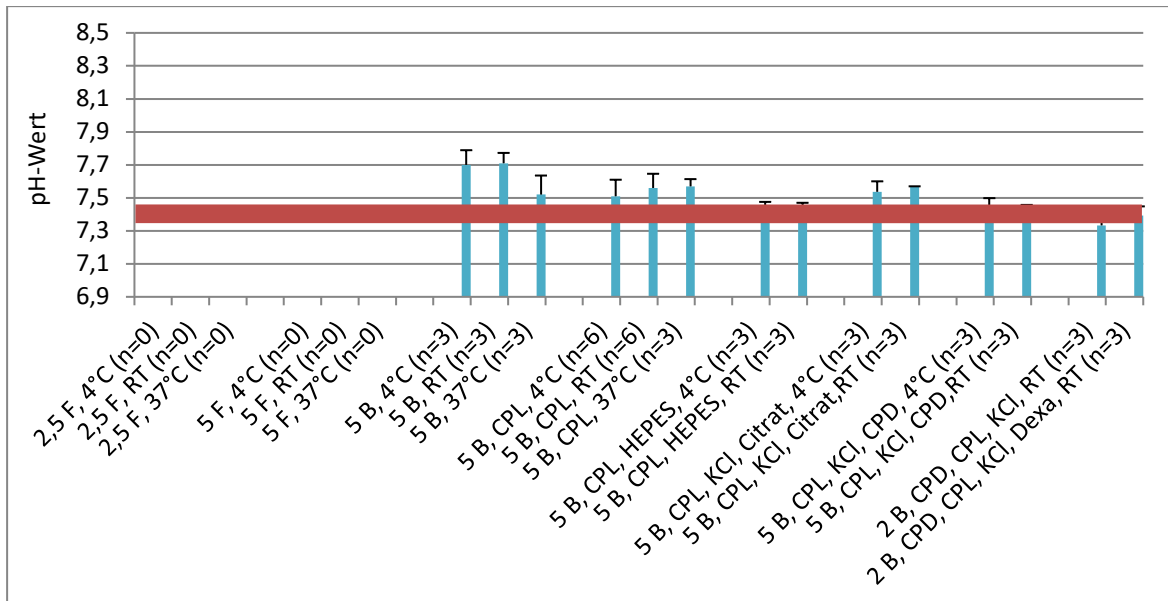
#### 4.4 pH-Wert über 72 Stunden

Der pH-Wert des für die Lagerung verwendeten Plasmas lag durchschnittlich deutlich über dem physiologischen Wert von 7,35-7,45 und stieg im Verlauf der Lagerung weiter an. Wegen des erwarteten Anstieges wurde der Wert ab der 4. Versuchsreihe mit Hilfe einer Citrat-Pufferlösung auf leicht azidotische Ausgangswerte zwischen 7,2 und 7,3 eingestellt. Die in Zellkulturflaschen gelagerten Ansätze der ersten und zweiten Versuchsreihe wurden erst während des dritten Versuchsdurchganges gemessen und dort nicht nach 24 Stunden, weswegen in diesem Diagramm kein Wert für die ersten zwei Versuchsreihen eingetragen ist.

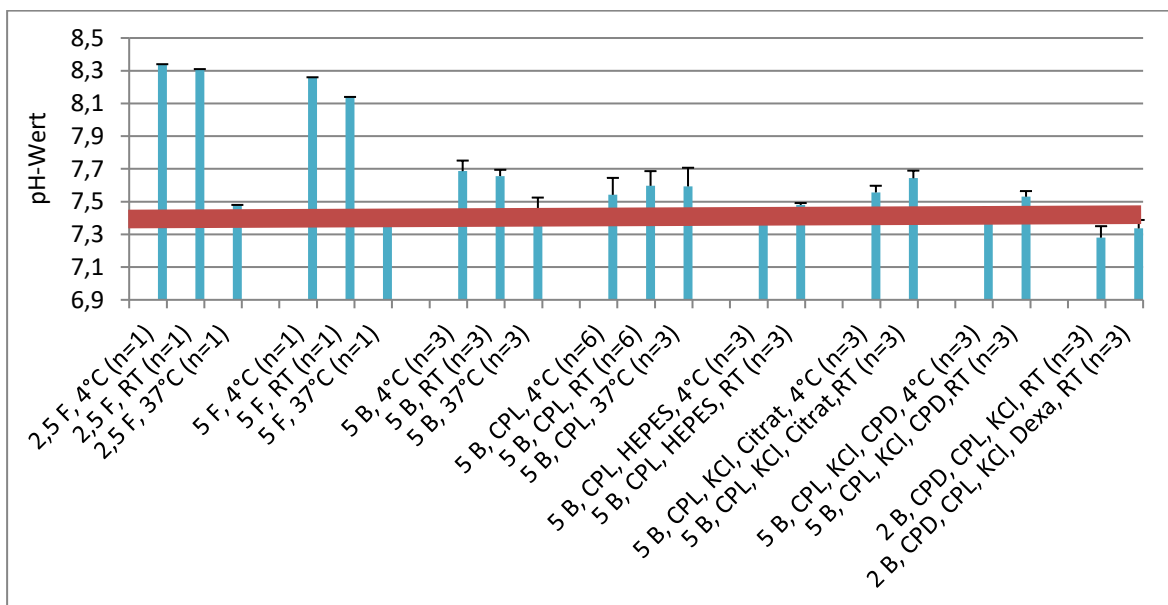


**Abb. 18: pH-Wert im aufgereinigten Leukozytenkonzentrat.** Abkürzungen: **2,5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2,5 \times 10^6/\text{ml}$ , **5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6/\text{ml}$ , **2**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7/\text{ml}$ , **F**: Lagerung in einer Zellkulturflasche, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l), **roter Balken**: physiologischer pH-Bereich (7,35-7,45).

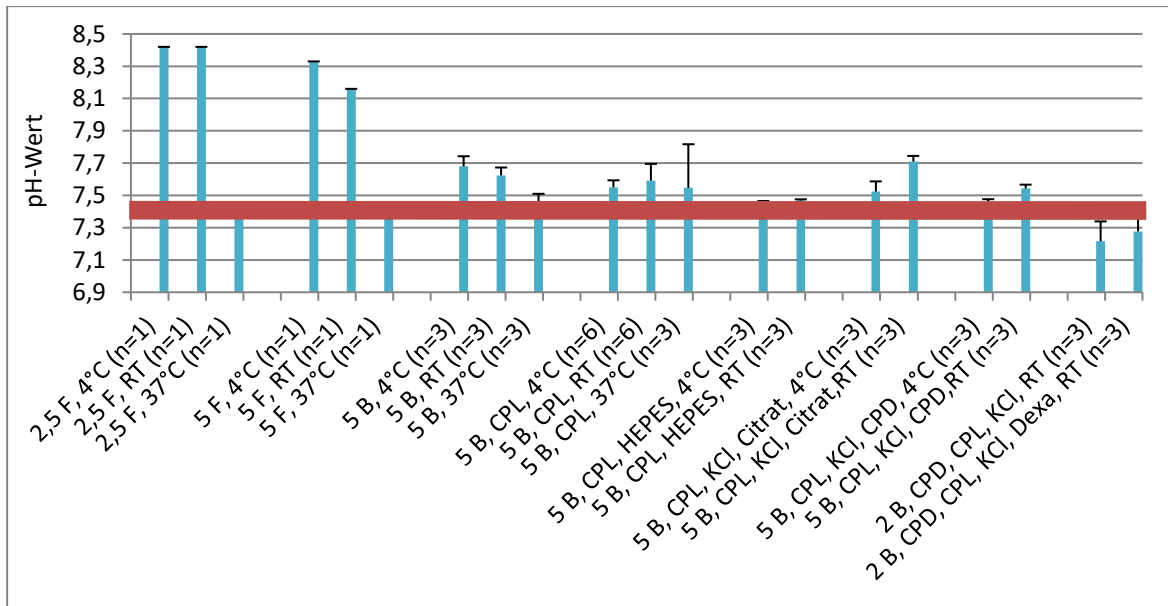
Im Vergleich zu den Ansätzen der ersten 3 Versuchsreihen war der pH-Wert in den frisch aufgereinigten, mit einer Citrat-Pufferlösung versetzten Leukozytenkonzentraten der Gruppen 4-8 deutlich niedriger. Er befand sich in allen diesen Ansätzen leicht unterhalb des physiologischen Bereiches.



**Abb. 19: pH-Wert nach 24 Stunden.** Abkürzungen: **2,5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2,5 \times 10^6/\text{ml}$ , **5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6/\text{ml}$ , **2**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7/\text{ml}$ , **F**: Lagerung in einer Zellkulturflasche, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l), **roter Balken**: physiologischer pH-Bereich (7,35-7,45).



**Abb. 20: pH-Wert nach 48 Stunden.** Abkürzungen: **2,5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2,5 \times 10^6/\text{ml}$ , **5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6/\text{ml}$ , **2**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7/\text{ml}$ , **F**: Lagerung in einer Zellkulturflasche, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l), **roter Balken**: physiologischer pH-Bereich (7,35-7,45).

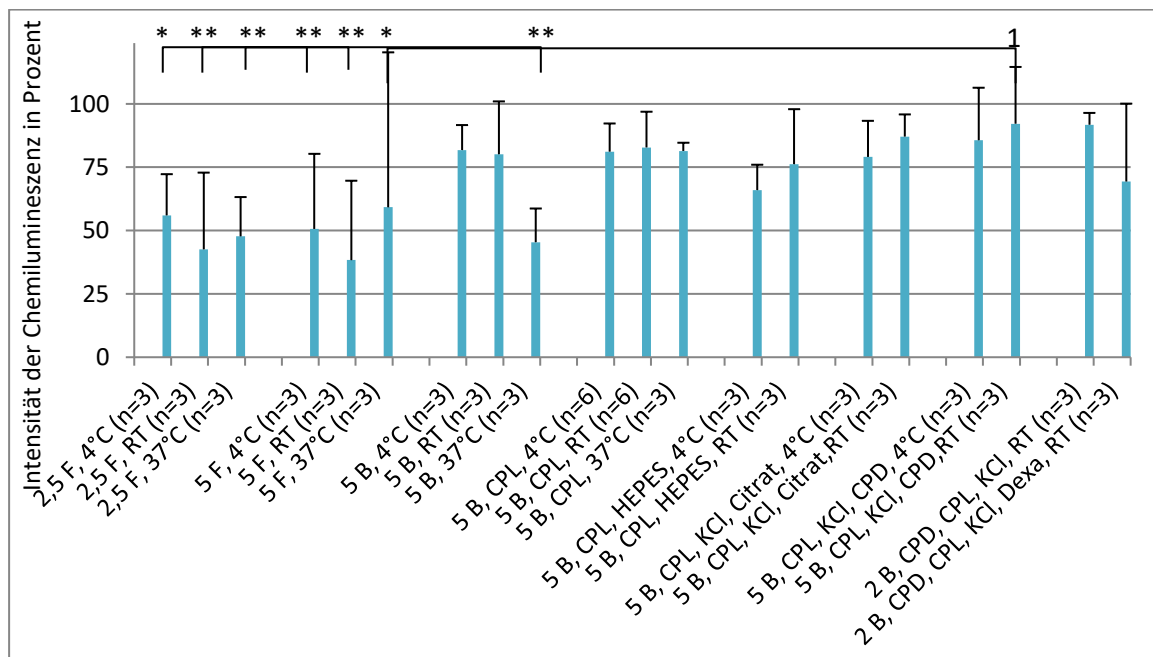


**Abb. 21: pH-Wert nach 72 Stunden.** Abkürzungen: **2,5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2,5 \times 10^6/\text{ml}$ , **5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6/\text{ml}$ , **2**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7/\text{ml}$ , **F**: Lagerung in einer Zellkulturflasche, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l), **roter Balken**: physiologischer pH-Bereich (7,35-7,45).

Im Verlauf von 72 Stunden kam es bei den meisten Ansätzen zu einem Anstieg des pH-Wertes. Zusammenfassend ergaben sich die höchsten Anstiege während der Lagerung in Flaschen im Vergleich zur Beutellagerung. Eine niedrigere Konzentration ging ebenfalls mit höheren pH-Werten einher. Wobei die am höchsten konzentrierten Zellen der 8. Versuchsreihe sich nach 72 Stunden als einzige Ansätze unterhalb des physiologischen Bereiches befanden. Die im  $\text{CO}_2$ -Brutschrank gelagerten Suspensionen befanden sich alle im physiologischen pH-Bereich. Es lässt sich ein leichter Trend zu geringeren pH-Anstiegen bei Lagerung in  $4^\circ\text{C}$  statt bei Raumtemperatur erkennen. Die mit HEPES gelagerten Zellsuspensionen verhielten sich ebenfalls stabiler in Bezug auf den pH-Wert.

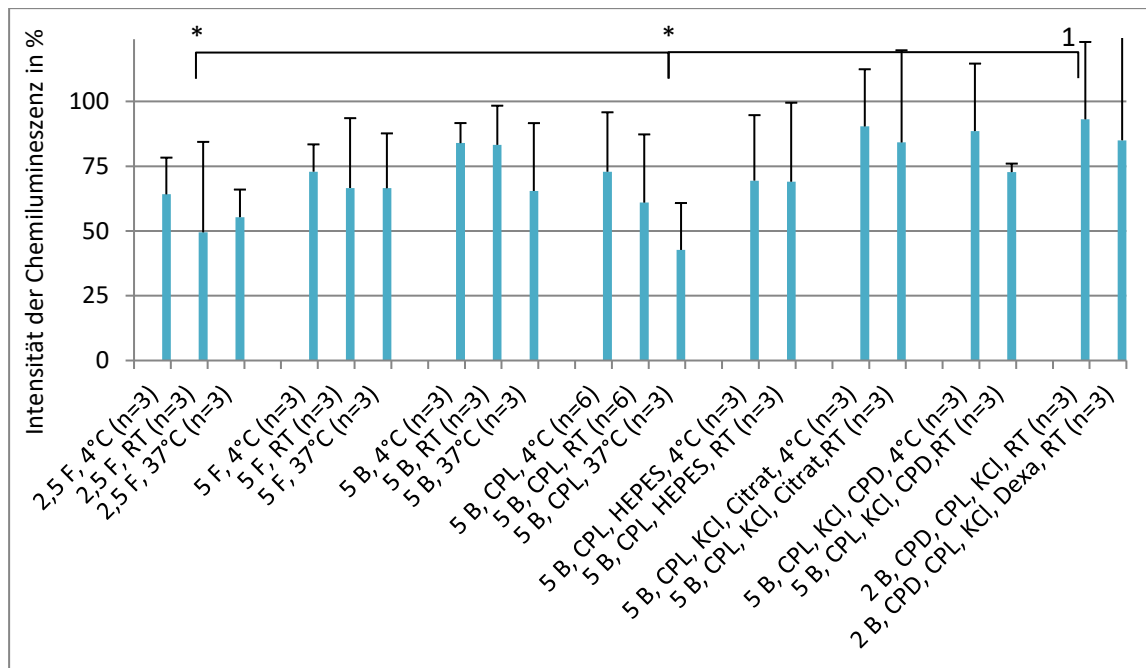
## 4.5 Chemilumineszenz über 72 Stunden

Insgesamt bewegte sich der Anteil der unstimulierten Aktivität im Verhältnis zur stimulierten Aktivität in Bereichen zwischen 0 und 5 Prozent und wurde daher in den Ergebnissen nicht zusätzlich aufgeführt. Die in Units berechnete unstimulierte Aktivität wurde jeweils von der stimulierten Aktivität abgezogen.



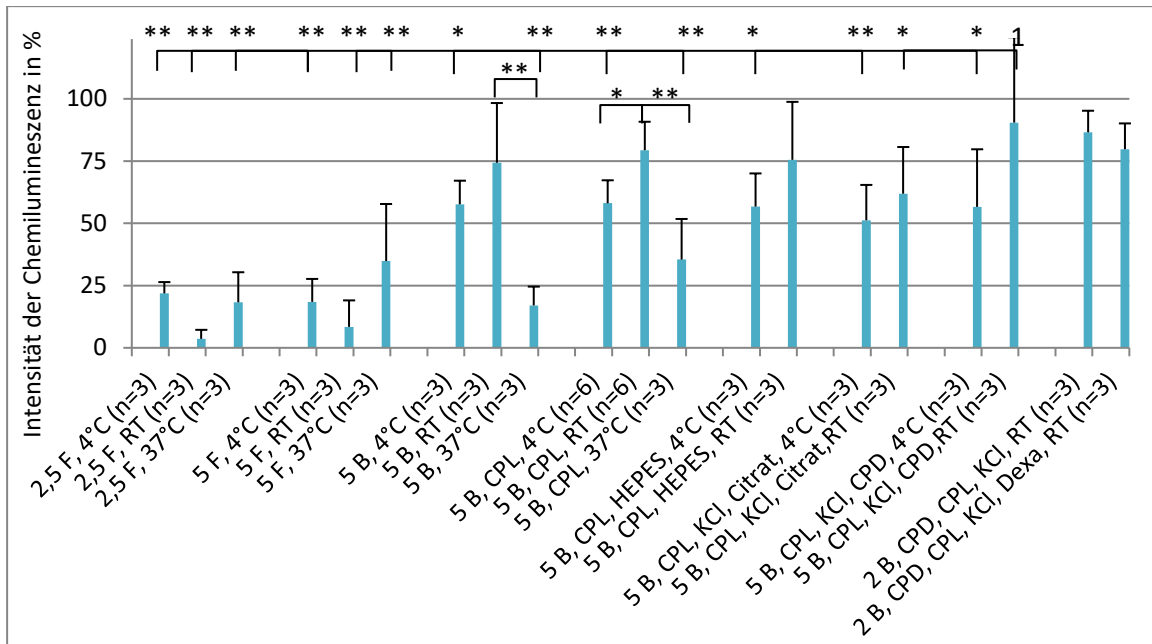
**Abb. 22: Intensität der Chemilumineszenz nach 24 Stunden in Prozent vom Ausgangswert, Lucigenin,** abzüglich der unstimulierten Aktivitäten, ausgehend vom Wert des frisch aufgereinigten Leukozytenkonzentrates. **Abkürzungen:** **2,5:** Konzentration weißer Blutzellen von  $2,5 \times 10^6/\text{ml}$ , **5:** Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6/\text{ml}$ , **2:** Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7/\text{ml}$ , **F:** Lagerung in einer Zellkulturflasche, **B:** Lagerung im Beutel, **RT:** Raumtemperatur, **CPL:** Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl:** Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat:** Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD:** Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa:** Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ ) **1:** Gruppe mit höchstem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

Nach 24 Stunden Lagerung kam es im Vergleich zum frisch aufgereinigten Leukozytenkonzentrat bereits zu deutlichen Abfällen in der Intensität der Chemilumineszenz. Bei der Messung mit Lucigenin waren die Verluste besonders stark bei den in Zellkulturflaschen gelagerten Zellen und bei der Lagerung im Beutel bei 37 °C (3. Versuchsreihe). Dort sank die Intensität unter 60 % des Ausgangswertes. Über 90% des Ausgangswertes erreichten die in CPD-Plasma und bei Raumtemperatur gelagerten Zellen der 7. Und 8. Versuchsreihe.



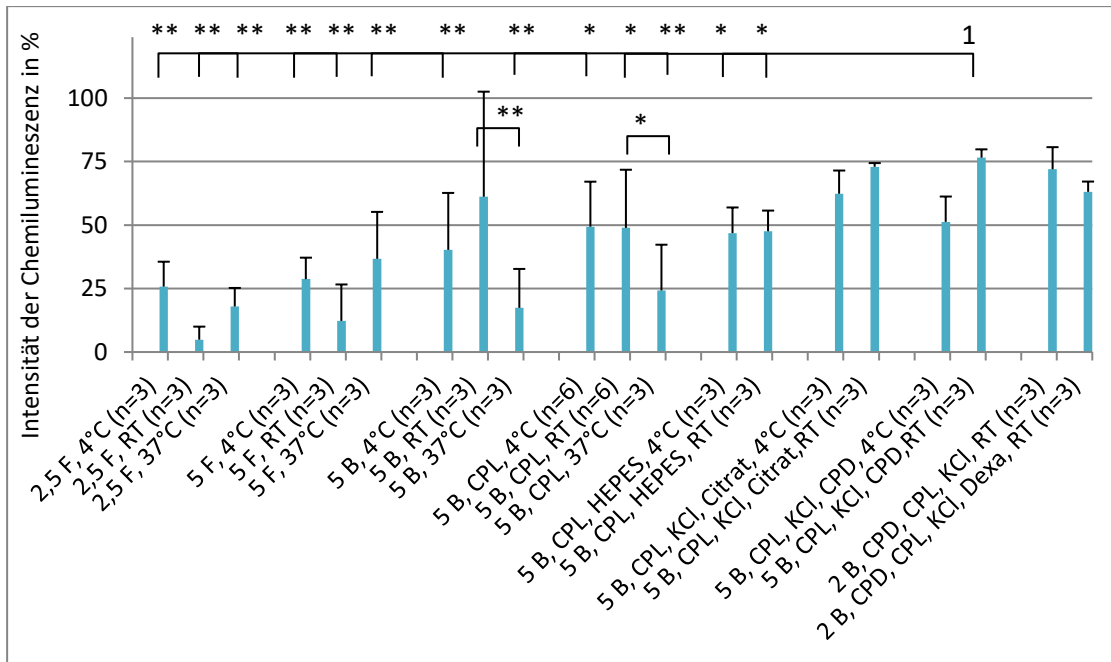
**Abb. 23: Intensität der Chemilumineszenz nach 24 Stunden in Prozent vom Ausgangswert, Luminol**, abzüglich der unstimulierten Aktivitäten, ausgehend vom Wert des frisch aufgereinigten Leukozytenkonzentrates **Abkürzungen:** **2,5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2,5 \times 10^6/\text{ml}$ , **5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6/\text{ml}$ , **2**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7/\text{ml}$ , **F**: Lagerung in einer Zellkulturflasche, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ ) **1**: Gruppe mit höchstem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

Bei Messung mit Luminol wiesen die Zellen der 8. Versuchsreihe, ohne Zugabe von Dexamethason die höchsten Aktivitätsniveaus auf, gefolgt von den bei  $4^\circ\text{C}$  gelagerten Zellen der 6. Und 7. Reihe. Signifikant schlechtere Ergebnisse erzielten auch hier die bei Raumtemperatur in Flaschen gelagerten Zellen der ersten Versuchsgruppe, mit der niedrigsten Konzentration an Granulozyten, sowie die bei  $37^\circ\text{C}$  und mit Citratpuffer im Beutel gelagerten Zellen der 4. Gruppe.

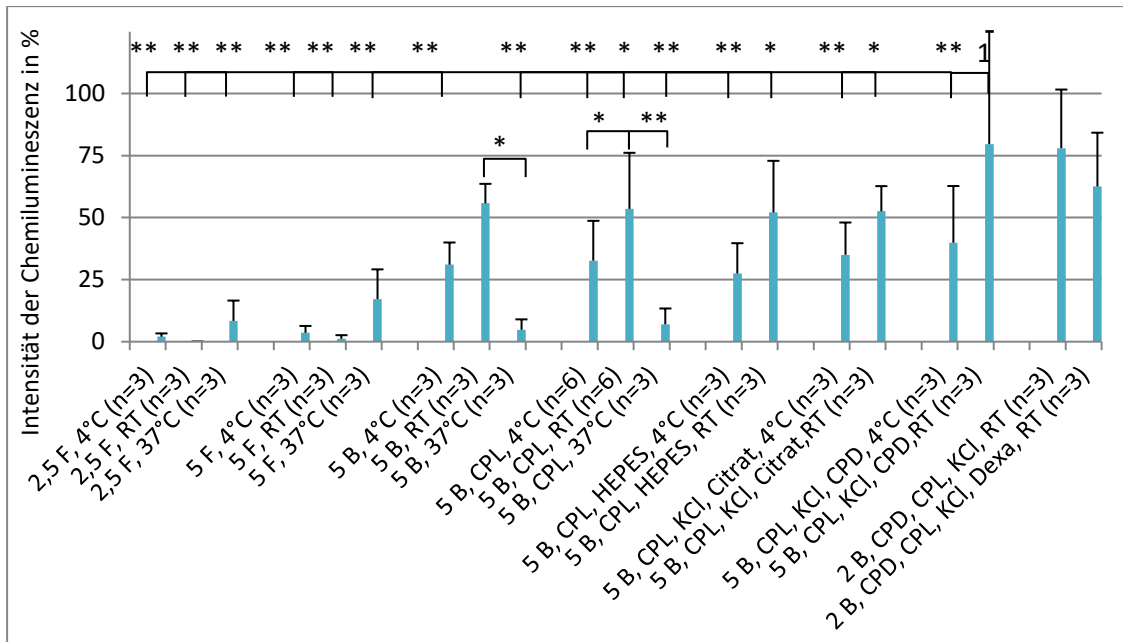


**Abb. 24: Intensität der Chemilumineszenz nach 48 Stunden in Prozent vom Ausgangswert, Lucigenin**, abzüglich der unstimulierten Aktivitäten, ausgehend vom Wert des frisch aufgereinigten Leukozytenkonzentrates **Abkürzungen:** **2,5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2,5 \times 10^6/\text{ml}$ , **5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6/\text{ml}$ , **2**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7/\text{ml}$ , **F**: Lagerung in einer Zellkulturflasche, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ ) **1**: Gruppe mit höchstem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

Nach 48 Stunden reduzierte sich die Intensität der Chemilumineszenz sowohl unter Messung mit Lucigenin als auch unter Luminol bei der Lagerung in Zellkulturflaschen noch stärker. Die höchsten Verluste wiesen hier die bei Raumtemperatur gelagerten Zellen auf. Weiterhin sehr schlecht schnitten die bei  $37^\circ\text{C}$  in luftundurchlässigen Beuteln gelagerten Zellen ab (Versuchsgruppe 3 und 4). Die in CPD-Plasma und bei Raumtemperatur gelagerten Zellen der 7. Und 8. Versuchsreihe erreichten wiederum die besten Ergebnisse von 80-90% des Ausgangswertes (Lucigenin) beziehungsweise von 63-77% (Luminol). Bei Messung mit Luminol befanden sich auch die Zellen der Citratgruppe (6) im Spitzenbereich. Im Temperaturvergleich schnitten bei der Beutellagerung die bei Raumtemperatur aufbewahrten Zellen jeweils besser ab. Signifikant waren diese Ergebnisse insgesamt in der 3. und 4. Versuchsgruppe, bei Messung mit Lucigenin zusätzlich noch in der 7. Versuchsgruppe.



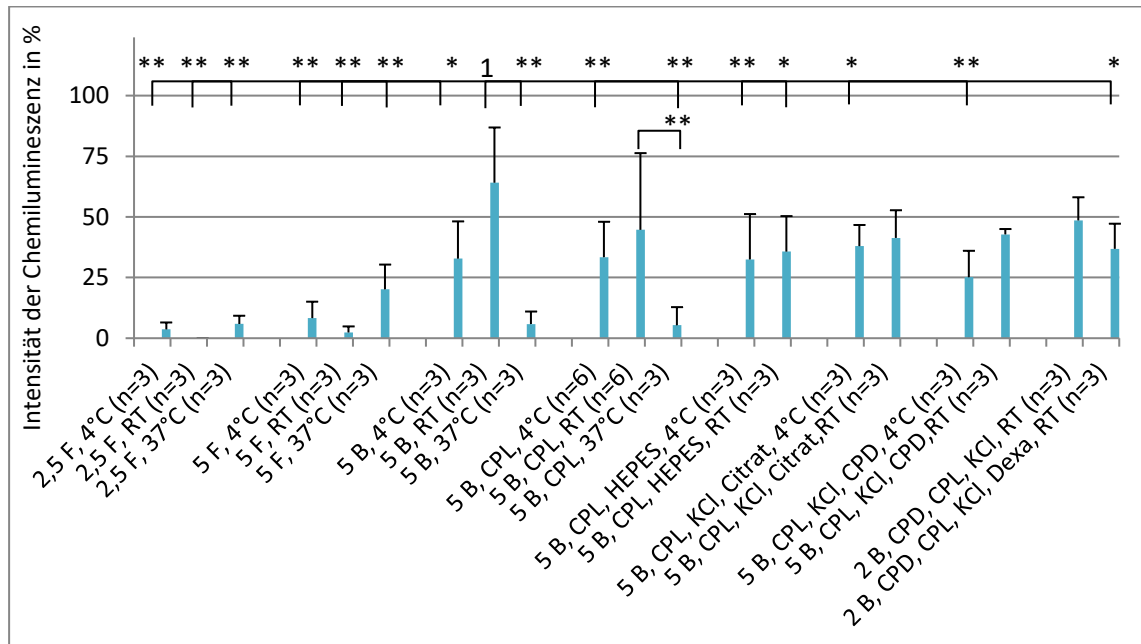
**Abb. 25: Intensität der Chemilumineszenz nach 48 Stunden in Prozent vom Ausgangswert, Luminol,** abzüglich der unstimulierten Aktivitäten, ausgehend vom Wert des frisch aufgereinigten Leukozytenkonzentrates. **Abkürzungen:** **2,5:** Konzentration weißer Blutzellen von  $2,5 \times 10^6/\text{ml}$ , **5:** Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6/\text{ml}$ , **2:** Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7/\text{ml}$ , **F:** Lagerung in einer Zellkulturflasche, **B:** Lagerung im Beutel, **RT:** Raumtemperatur, **CPL:** Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl:** Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat:** Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD:** Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa:** Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ ) **1:** Gruppe mit höchstem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .



**Abb. 26: Intensität der Chemilumineszenz nach 72 Stunden in Prozent vom Ausgangswert, Lucigenin, abzüglich der unstimulierten Aktivitäten, ausgehend vom Wert des frisch aufgereinigten Leukozytenkonzentrates. Abkürzungen: 2,5:** Konzentration weißer Blutzellen von  $2,5 \times 10^6/\text{ml}$ , **5:** Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6/\text{ml}$ , **2:** Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7/\text{ml}$ , **F:** Lagerung in einer Zellkulturflasche, **B:** Lagerung im Beutel, **RT:** Raumtemperatur, **CPL:** Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl:** Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat:** Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD:** Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa:** Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ ) **1:** Gruppe mit höchstem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

Nach 72 Stunden Lagerung zeigte sich die stärkste Reduktion der Chemilumineszenzintensität bei den Ansätzen in Zellkulturflaschen und den bei  $37^\circ\text{C}$  in Beuteln gelagerten Zellen. Im Vergleich der Gruppen 1 und 2 schnitten jeweils die höher konzentrierten und die bei  $37^\circ\text{C}$  gelagerten Zellen am besten ab, die bei Raumtemperatur aufbewahrten am schlechtesten. Unter Lucigenin erzielten, wie in den vorangegangenen Messungen die letzten 3 Ansätze (Zellen bei Raumtemperatur in CPD-Plasma,  $5 \times 10^6$  bzw.  $2 \times 10^7$  Zellen/ml, mit und ohne Dexamethason) sowie die bei Raumtemperatur gelagerten Zellen der 3. Versuchsreihe die besten Ergebnisse. Die Intensität der Chemilumineszenz lag hier zwischen 56 und 80% des Ausgangswertes. Bei der Messung mit Luminol lagen die Werte insgesamt niedriger. Den höchsten Wert erzielten hier die bei Raumtemperatur und ohne Citratpuffer gelagerten Zellen der 3. Versuchsreihe mit gut 64% des Ausgangswertes. An zweiter Stelle mit knapp 49% des Ausgangswertes befanden sich die hoch konzentrierten Zellen der 8. Versuchsgruppe ohne Dexamethason. Ebenfalls nicht signifikant schlechter schnitten die Zellen der 4., 6. und 7. Versuchsreihe bei Lagerung in

Raumtemperatur ab. Die mit Dexamethason versehenen Zellen erzielten im Durchschnitt bei allen Messungen niedrigere Ergebnisse als die Vergleichsgruppe, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

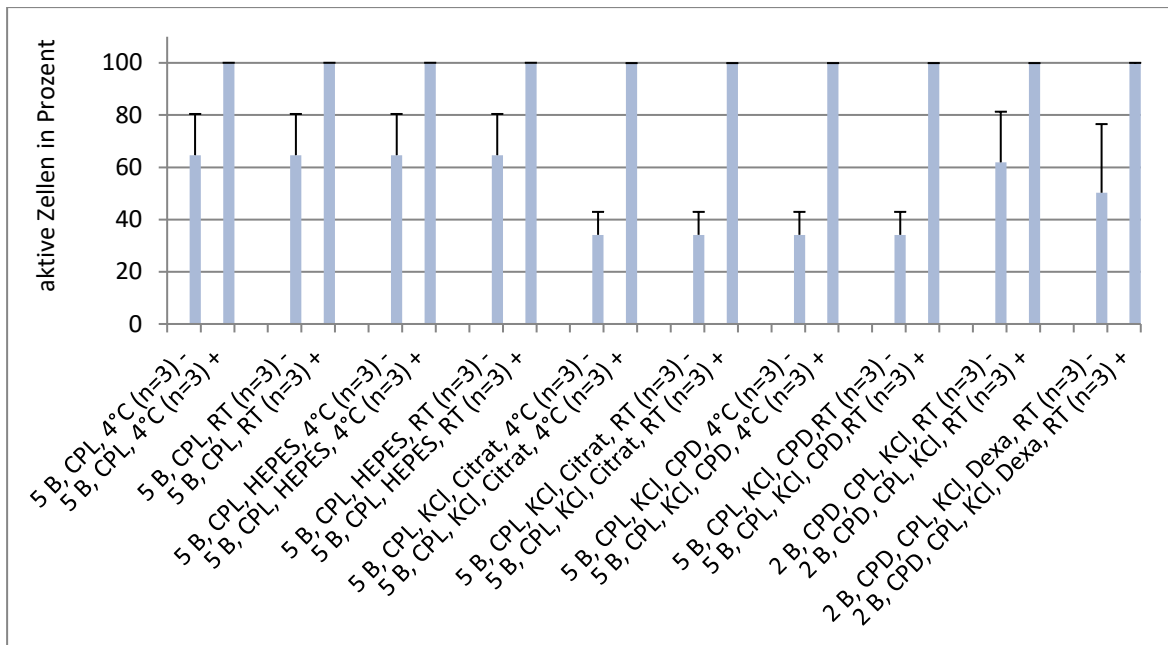


**Abb. 27: Intensität der Chemilumineszenz nach 72 Stunden in Prozent vom Ausgangswert , Luminol, abzüglich der unstimulierten Aktivitäten, ausgehend vom Wert des frisch aufgereinigten Leukozytenkonzentrates. Abkürzungen: 2,5: Konzentration weißer Blutzellen von  $2,5 \times 10^6$ /ml, 5: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, 2: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, F: Lagerung in einer Zellkulturflasche, B: Lagerung im Beutel, RT: Raumtemperatur, CPL: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), KCl: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), Citrat: Lagerung der Zellen in Citratplasma, CPD: Lagerung in CPD-Plasma, Dexa: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l) 1: Gruppe mit höchstem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .**

## 4.6 Oxyburst und Phagozytose über 72 Stunden

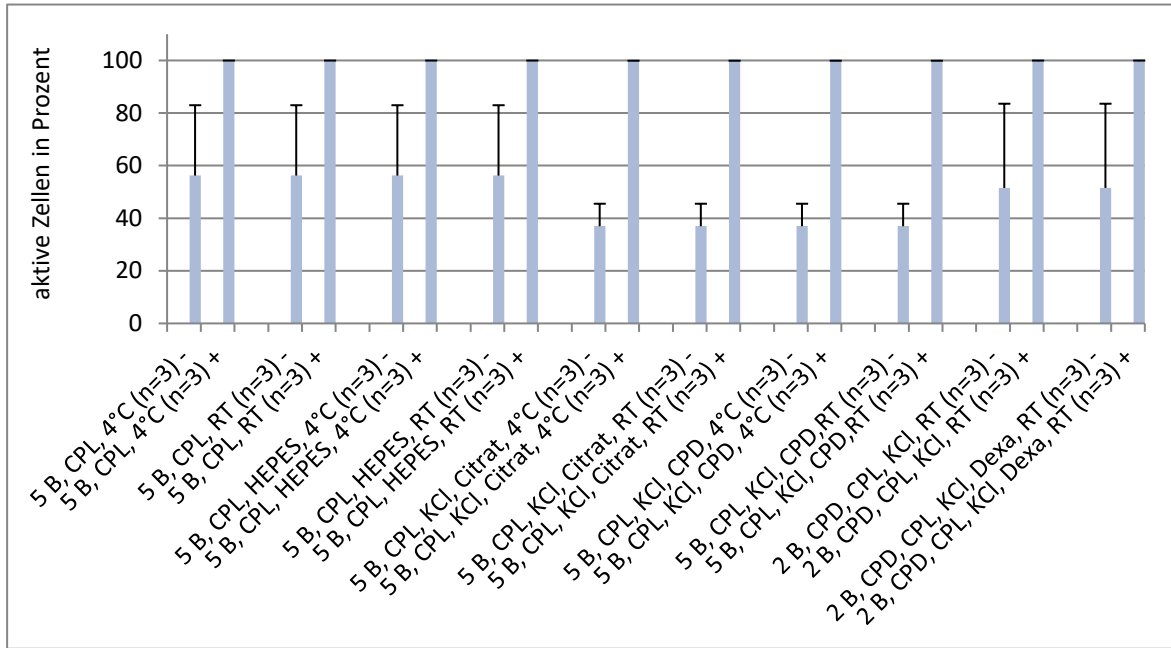
### Oxyburst

Die durchflusszytometrischen Bestimmungen von Phagozytose und Oxyburst wurden ab der 4. Versuchsreihe durchgeführt. Die Zellen für die Versuchsreihe 4 bis 7 wurden jeweils aus einem Buffy Coat gewonnen. Die Zellen für die höher konzentrierte 8. Versuchsreihe entstanden durch das poolen zweier verschiedener Buffy Coats. Die Intensität des Oxybursts und der Phagozytose in der Negativkontrolle (ohne DHR und ohne e-coli) lag durchgehend zwischen max. 5 und unter einem Prozent und wurde in diesem Fall nicht von den positiven Werten abgezogen.

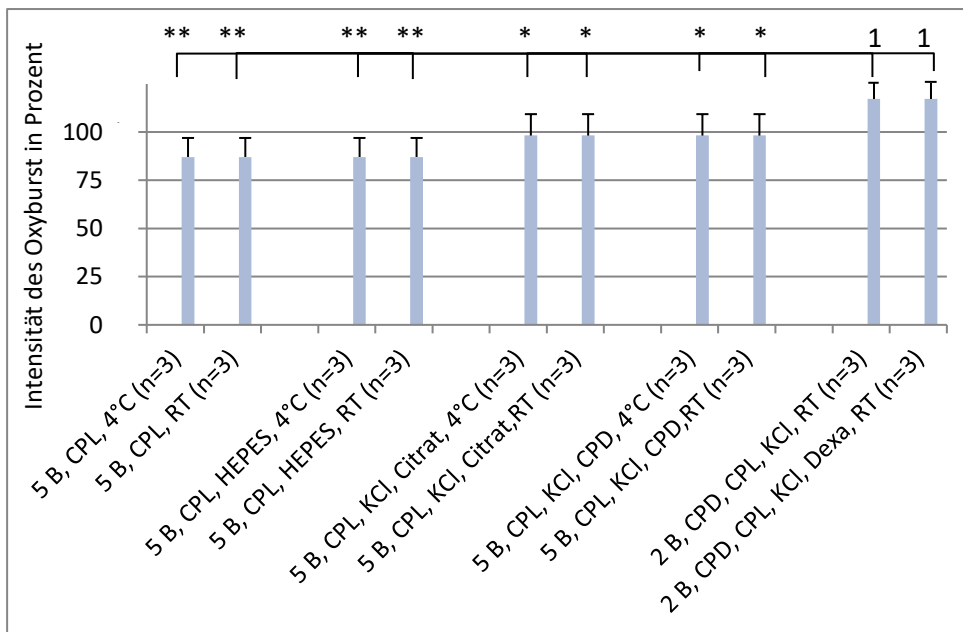


**Abb. 28:** Anteil der am Oxyburst beteiligten Zellen in Prozent ohne (-) und mit (+) Stimulation im Buffy Coat.

**Abkürzungen:** **5:** Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6/\text{ml}$ , **2:** Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7/\text{ml}$ , **B:** Lagerung im Beutel, **RT:** Raumtemperatur, **CPL:** Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl:** Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat:** Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD:** Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa:** Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l).

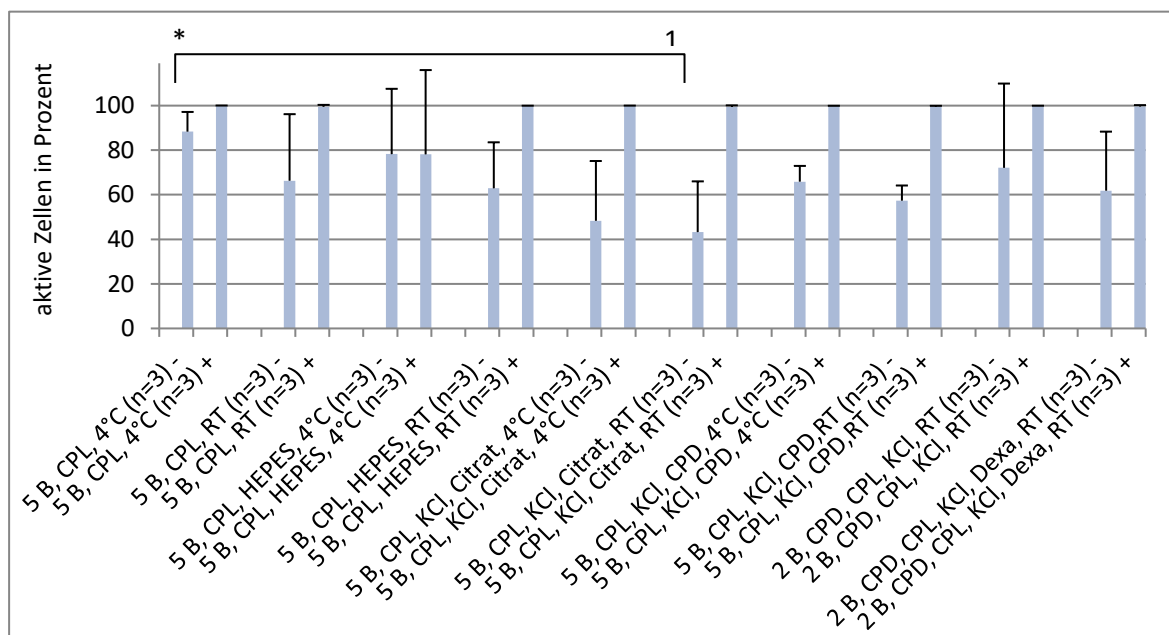


**Abb. 29: Anteil der am Oxyburst beteiligten Zellen in Prozent ohne (-) und mit (+) Stimulation im Leukozytenkonzentrat. Abkürzungen:** **5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, **2**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l).

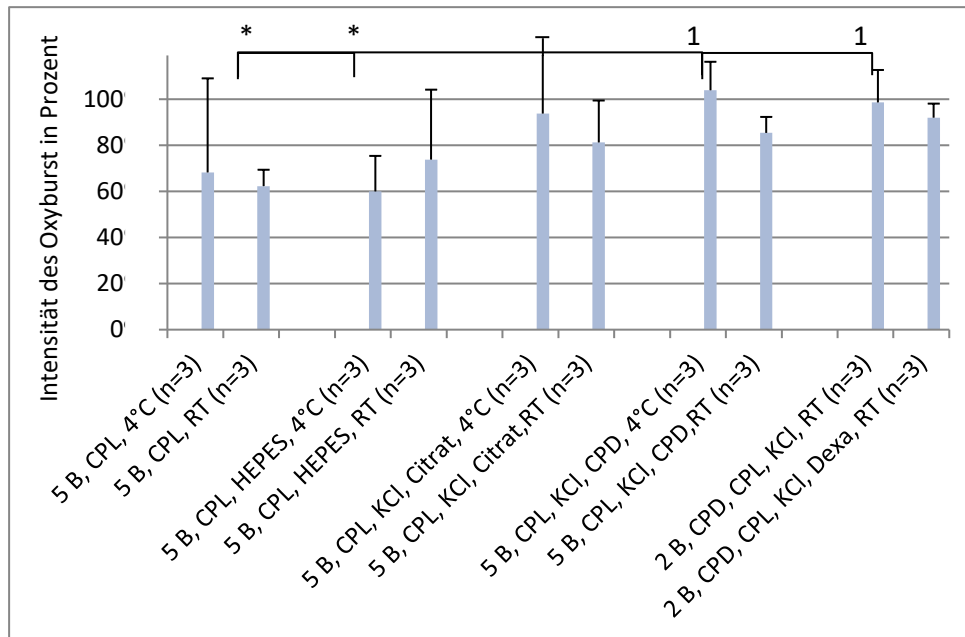


**Abb. 30: Intensität des Oxyburst in Prozent, bezogen auf den Buffy Coat im aufgereinigten Leukozytenkonzentrat. Abkürzungen:** **5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, **2**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l), **1**: Gruppe mit bestem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

Der Anteil der nach Stimulation durch Bakterien am Oxyburst beteiligten Zellen lag sowohl im Buffy Coat als auch direkt nach der Aufreinigung im Granulozytenkonzentrat bei annähernd 100%. In den Buffy Coats der 4./5. und 8. Versuchsreihe zeigten 60% der Zellen auch ohne Stimulation spontane Aktivität. Nach der Aufreinigung hatte sich dieser Wert um durchschnittlich ca. 10 Prozent reduziert. Die Intensität des Oxyburst hatte sich in der 4. und 5. Versuchsreihe (hier Ansätze 1 – 4) nach der Aufreinigung auf 87% des Ausgangswertes reduziert. In der 6. und 7. Versuchsreihe (hier Ansätze 5 - 8) lag der Wert nach der Aufreinigung bei 98% und in der 8. Versuchsreihe (hier Ansätze 9 und 10), die durch poolen von 2 Buffy Coats entstanden waren, hatte sich die Intensität auf 117% des Ausgangswertes erhöht. Die Leukozytenkonzentrate aus den gepoolten Buffy Coats wiesen bezogen auf die Ausgangsaktivität eine signifikant bzw. hochsignifikant höhere Aktivität auf, als die aus einem einzelnen Buffy Coat gewonnenen Zellen.

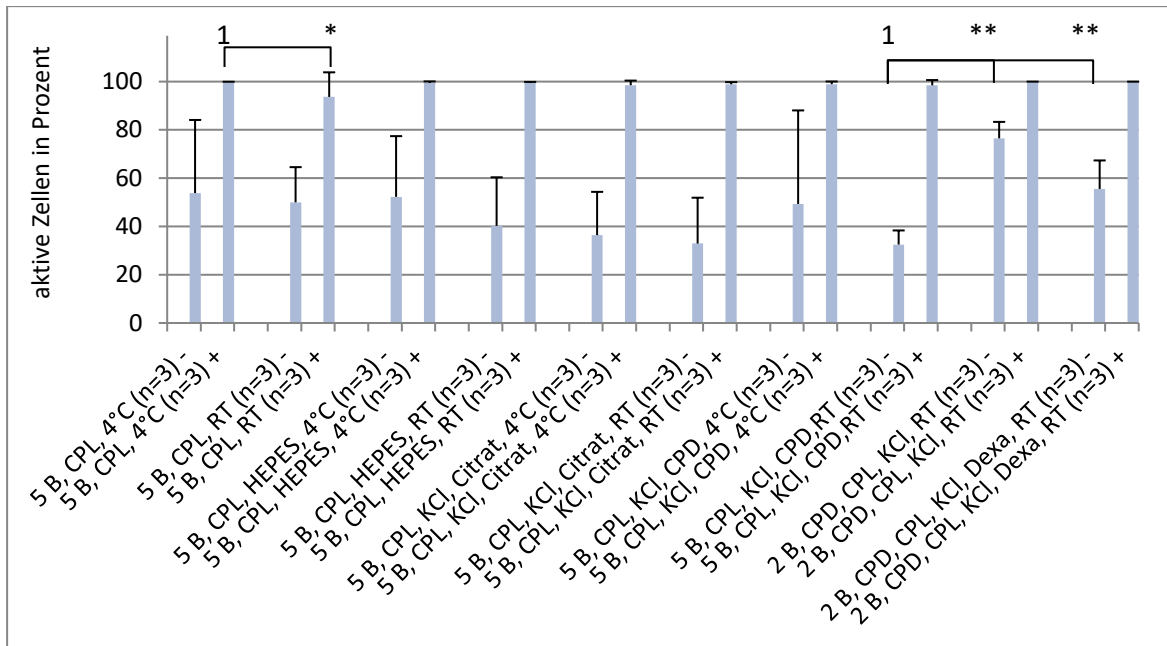


**Abb. 31: Anteil der am Oxyburst beteiligten Zellen in Prozent ohne (-) und mit (+) Stimulation nach 24 Stunden. Abkürzungen:** **5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, **2**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l), **1**: Gruppe mit bestem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

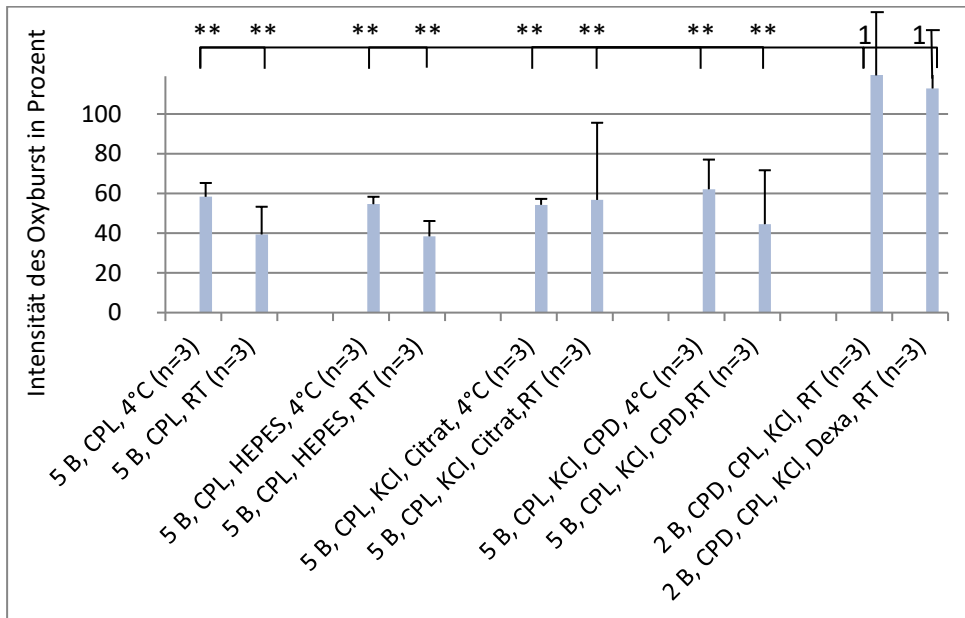


**Abb. 32: Intensität des Oxyburst in Prozent, bezogen auf den Buffy Coat nach 24 Stunden.**  
**Abkürzungen:** **5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, **2**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l), **1**: Gruppe mit bestem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

Nach 24 Stunden Lagerung nahmen -bis auf die bei 4°C in HEPES gelagerten Zellen- bei Stimulation immernoch ca. 100% der Zellen am Oxyburst teil. Der Anteil spontan aktiver Zellen erhöhte sich durchschnittlich bei Lagerung im Kühlschrank etwas stärker als bei Raumtemperatur, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Die mit Dexamethason versetzten Ansätze zeigten etwas niedrigere Anteile spontan aktiver Zellen, als die Vergleichsgruppe, jedoch war auch dieser Unterschied nicht signifikant. Insgesamt bewegten sich die Intensitäten des Oxybursts nach 24 Stunden Lagerung zwischen knapp 60 und über 100 Prozent des Ausgangswertes. Die bei 4°C in CPD-Plasma gelagerten Zellen erzielten die höchsten Ergebnisse. Signifikant schlechter schnitt die Lagerung bei Raumtemperatur ohne Zusätze und bei 4°C und Zugabe von HEPES ab. Weitere jedoch nicht signifikante Unterschiede: die bei 4°C gelagerten Zellen wiesen jeweils etwas höhere Ergebnisse, als die bei Raumtemperatur gelagerten auf. Die in CPD-Plasma gelagerten Zellen erzielten bei beiden Temperaturen durchschnittlich jeweils leicht höhere Werte, als die Vergleichsgruppe mit Citratplasma. Bei den Ansätzen ohne Dexamethason lag die Intensität des Oxyburst etwas höher als in der Vergleichsgruppe.

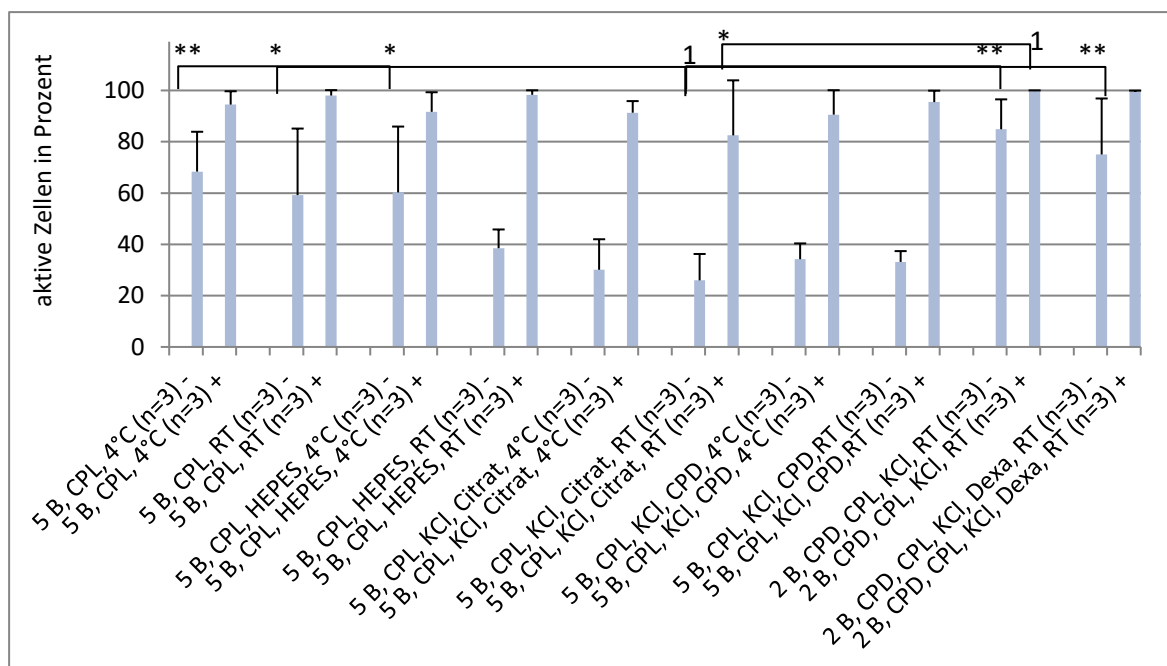


**Abb. 33: Anteil der am Oxyburst beteiligten Zellen in Prozent ohne (-) und mit (+) Stimulation nach 48 Stunden.**  
**Abkürzungen:** **5:** Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, **2:** Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, **B:** Lagerung im Beutel, **RT:** Raumtemperatur, **CPL:** Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl:** Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat:** Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD:** Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa:** Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l), **1:** Gruppe mit bestem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

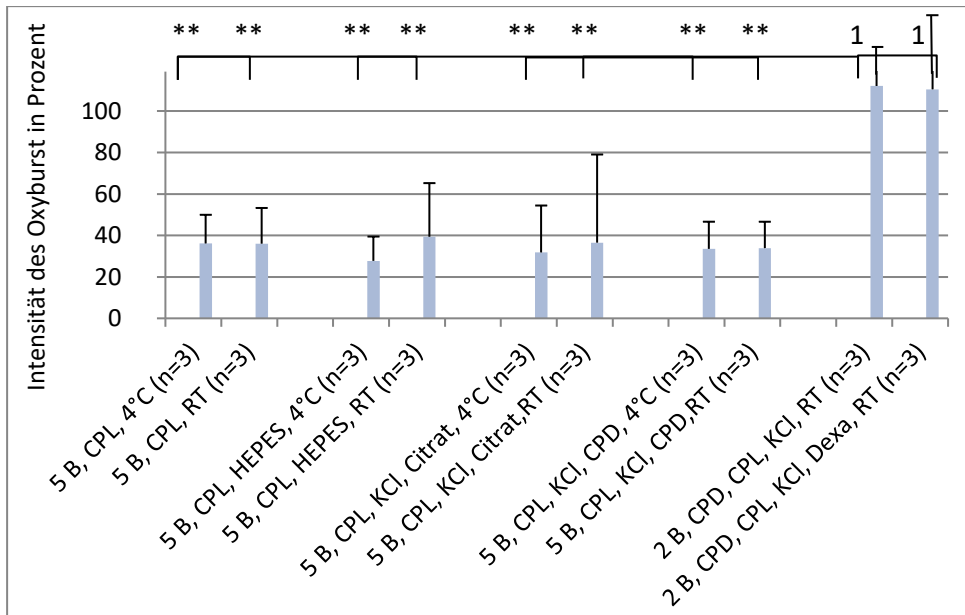


**Abb. 34: Intensität des Oxyburst in Prozent, bezogen auf den Buffy Coat nach 48 Stunden.**  
**Abkürzungen:** **5:** Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, **2:** Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, **B:** Lagerung im Beutel, **RT:** Raumtemperatur, **CPL:** Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl:** Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat:** Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD:** Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa:** Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l), **1:** Gruppe mit bestem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

Auch nach 48 Stunden waren bei Stimulation durchschnittlich noch fast alle Zellen am Oxyburst beteiligt, signifikant niedrigere Werte, als die beste Gruppe wiesen nur die bei Raumtemperatur, ohne Zusätze gelagerten Zellen (4. Versuchsreihe) auf. Die unstimulierte Aktivität blieb teilweise weiterhin hoch, den niedrigsten Wert wiesen hier die in CPD-Plasma bei Raumtemperatur gelagerten Zellen auf, den höchsten die hoch konzentrierten Ansätze mit und ohne Dexamethason. Diese beiden zeigten bezüglich der Intensität des Oxyburst mit über 100% des Ausgangswertes die besten Ergebnisse. In den niedriger dosierten Ansätzen kam es zu signifikant niedrigeren Werten mit Aktivitätsniveaus zwischen 38 und 62 Prozent der Ausgangswerte. Das nach 24 Stunden beobachtete nicht signifikante Muster von höherer Aktivität bei der Lagerung im Kühlschrank (nun auch bei den HEPES-Ansätzen) setzte sich fort.



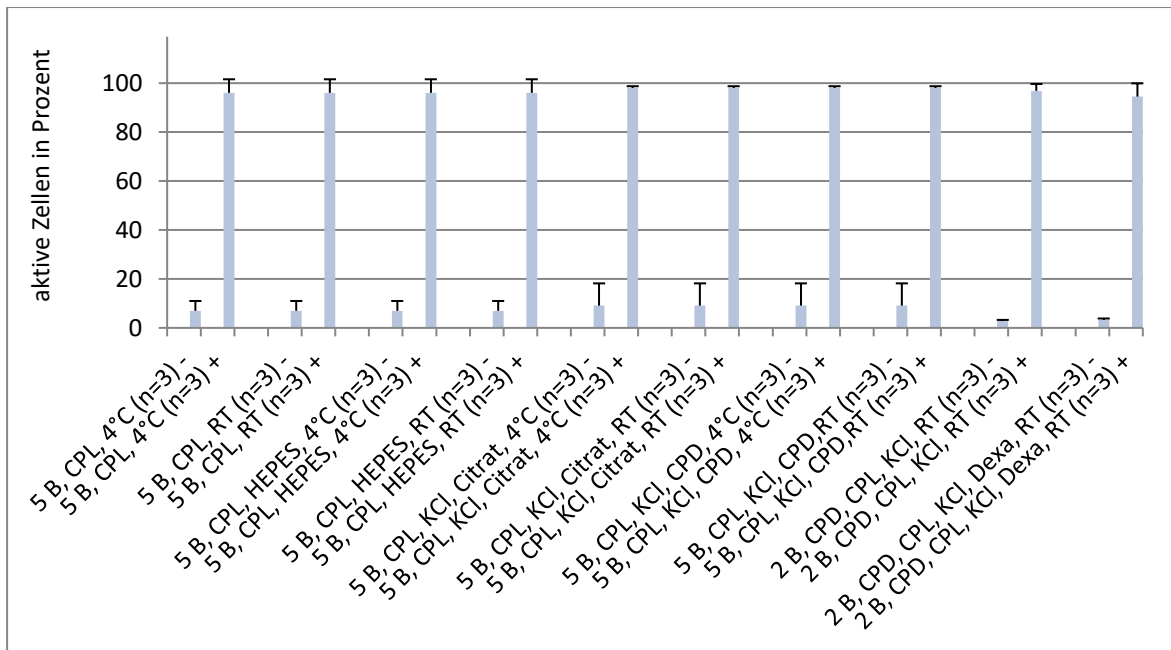
**Abb. 35: Anteil der am Oxyburst beteiligten Zellen in Prozent ohne (-) und mit (+) Stimulation nach 72 Stunden. Abkürzungen: 5:** Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6/\text{ml}$ , **2:** Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7/\text{ml}$ , **B:** Lagerung im Beutel, **RT:** Raumtemperatur, **CPL:** Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl:** Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat:** Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD:** Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa:** Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l), **1:** Gruppe mit bestem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .



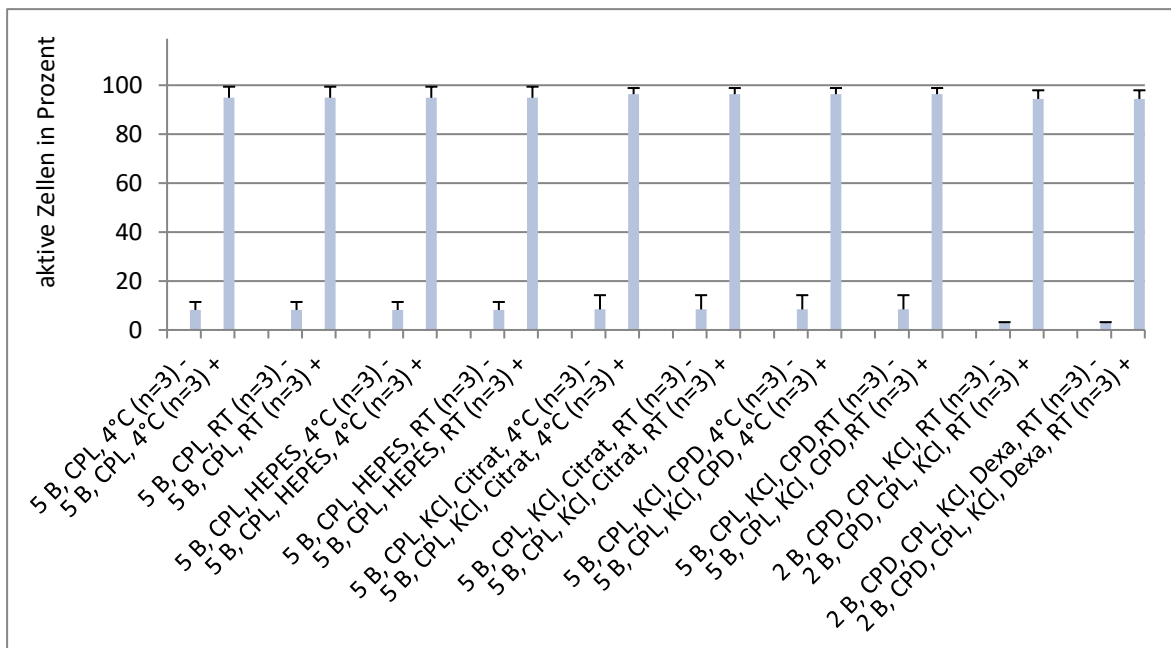
**Abb. 36: Intensität des Oxyburst in Prozent, bezogen auf den Buffy Coat nach 72 Stunden.**  
**Abkürzungen:** **5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6/\text{ml}$ , **2**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7/\text{ml}$ , **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l), **1**: Gruppe mit bestem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

Nach 72 Stunden Lagerung kam es in Hinblick auf den Anteil der aktiven Zellen in einigen Ansätzen zu deutlichen Abfällen, der Wert sank aber in keiner Gruppe unter 80 Prozent. Hinsichtlich dem Anteil spontan aktiver Zellen wiesen die höher konzentrierten Ansätze, wie auch die im Beutel ohne Zusätze und bei 4°C mit HEPES gelagerten Zellen signifikant höhere Werte auf als die Zellen der anderen Ansätze. Bezüglich der Intensität des Oxyburst zeigten die hoch konzentrierten Ansätze mit und ohne Dexamethason die besten Ergebnisse mit Werten über 100% ausgehend vom Buffy Coat. Bei allen anderen Ansätzen kam es im Vergleich dazu zu hochsignifikant schlechteren Aktivitätsniveaus. Die Aktivität fiel in allen Gruppen auf Werte unter 40% des Ausgangswertes ab. Die besten Werte erzielte hier noch der Ansatz bei Raumtemperatur und HEPES mit einem durchschnittlichen Wert von 39%.

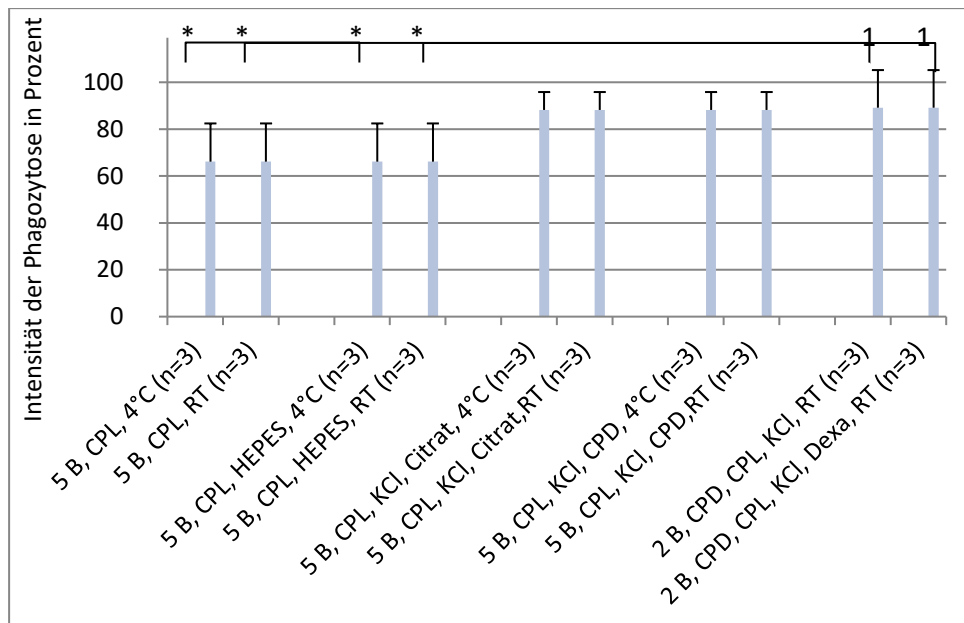
## Phagozytose



**Abb. 37: Anteil der an der Phagozytose beteiligten Zellen in Prozent ohne (-) und mit (+) Stimulation im Buffy Coat. Abkürzungen:** 5: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, 2: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, B: Lagerung im Beutel, RT: Raumtemperatur, CPL: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), KCl: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), Citrat: Lagerung der Zellen in Citratplasma, CPD: Lagerung in CPD-Plasma, Dexa: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l).

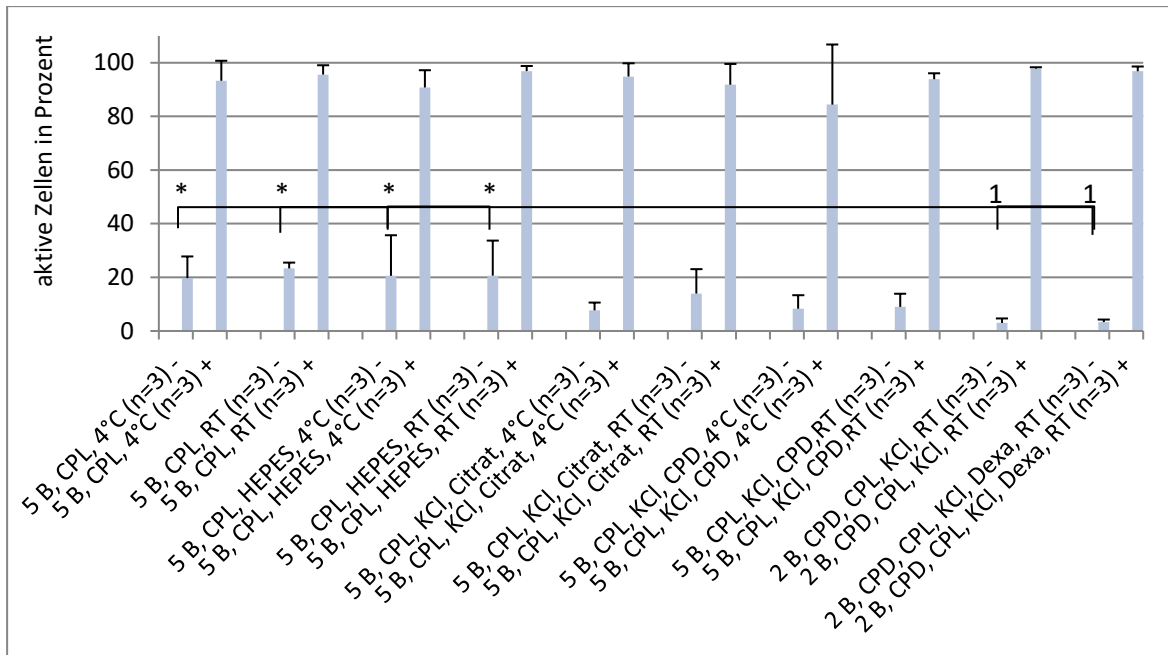


**Abb. 38: Anteil der an der Phagozytose beteiligten Zellen in Prozent ohne (-) und mit (+) Stimulation im Leukozytenkonzentrat. Abkürzungen:** 5: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, 2: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, B: Lagerung im Beutel, RT: Raumtemperatur, CPL: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), KCl: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), Citrat: Lagerung der Zellen in Citratplasma, CPD: Lagerung in CPD-Plasma, Dexa: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l).

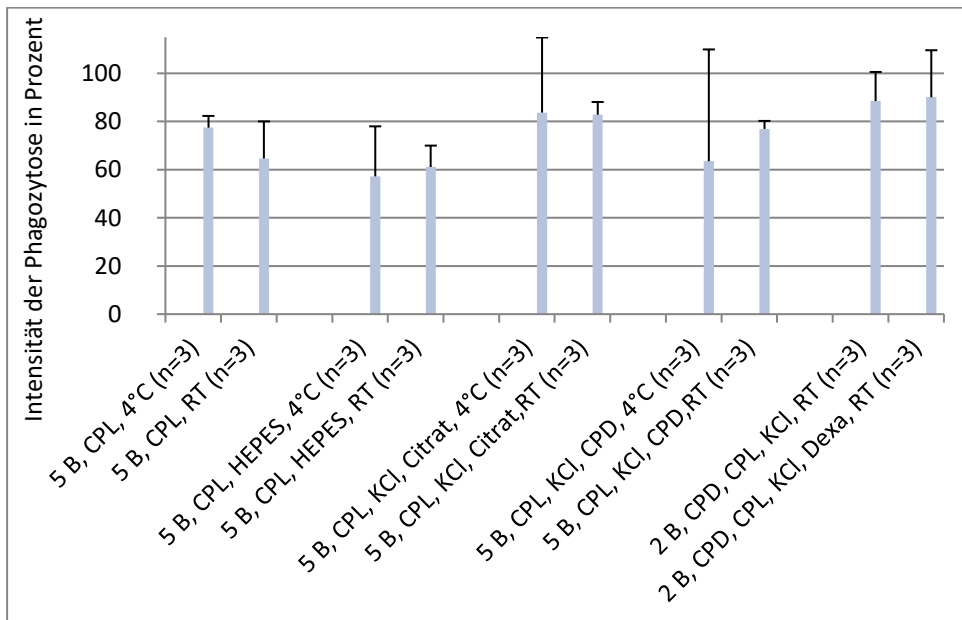


**Abb. 39: Intensität der Phagozytose in Prozent, bezogen auf den Buffy Coat im aufgereinigten Leukozytenkonzentrat. Abkürzungen: 5: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, 2: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, B: Lagerung im Beutel, RT: Raumtemperatur, CPL: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), KCl: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), Citrat: Lagerung der Zellen in Citratplasma, CPD: Lagerung in CPD-Plasma, Dexa: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l), 1: Gruppe mit bestem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .**

Die Anzahl der an der Phagozytose beteiligten Zellen hatte sich nach der Aufreinigung teilweise um einige Prozentpunkte reduziert. Die Anzahl der spontan aktiven Zellen lag vor und nach der Aufreinigung unter 10 Prozent und damit deutlich niedriger als die entsprechenden Werte für den Oxyburst. Bezogen auf die Phagozytoseintensität des Buffy Coats kam es in den frisch aufgereinigten LKs zu Verlusten zwischen 11 und 34 Prozent.



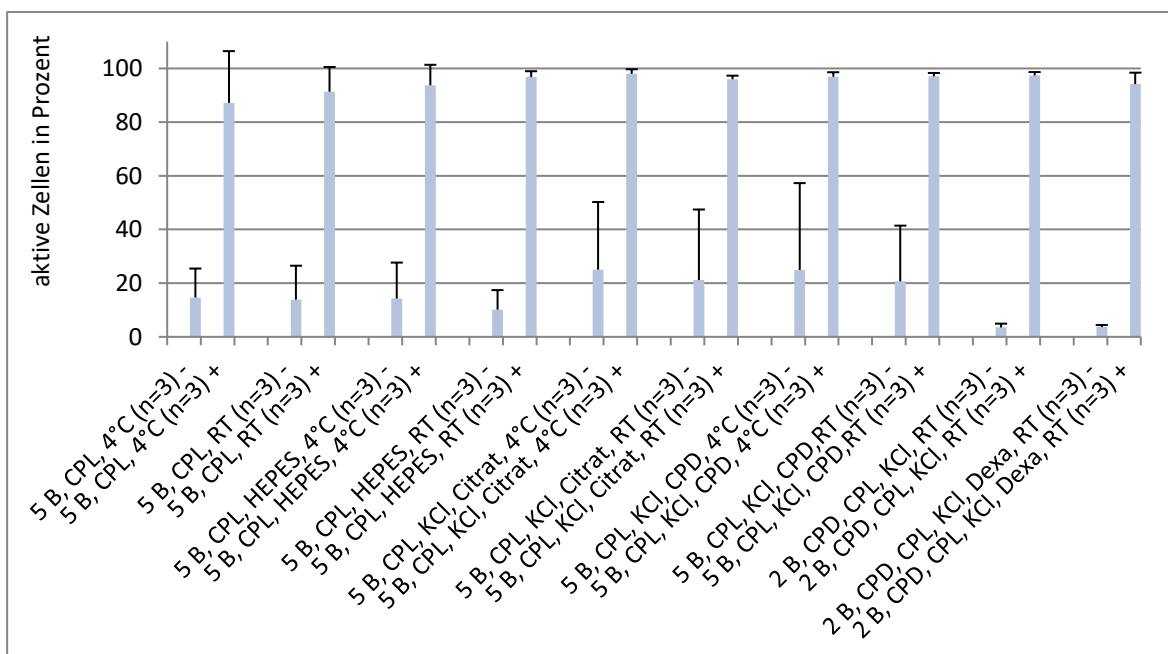
**Abb. 40: Anteil der an der Phagozytose beteiligten Zellen in Prozent ohne (-) und mit (+) Stimulation nach 24 Stunden. Abkürzungen:** **5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6/\text{ml}$ , **2**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7/\text{ml}$ , **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l), **1**: Gruppe mit bestem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .



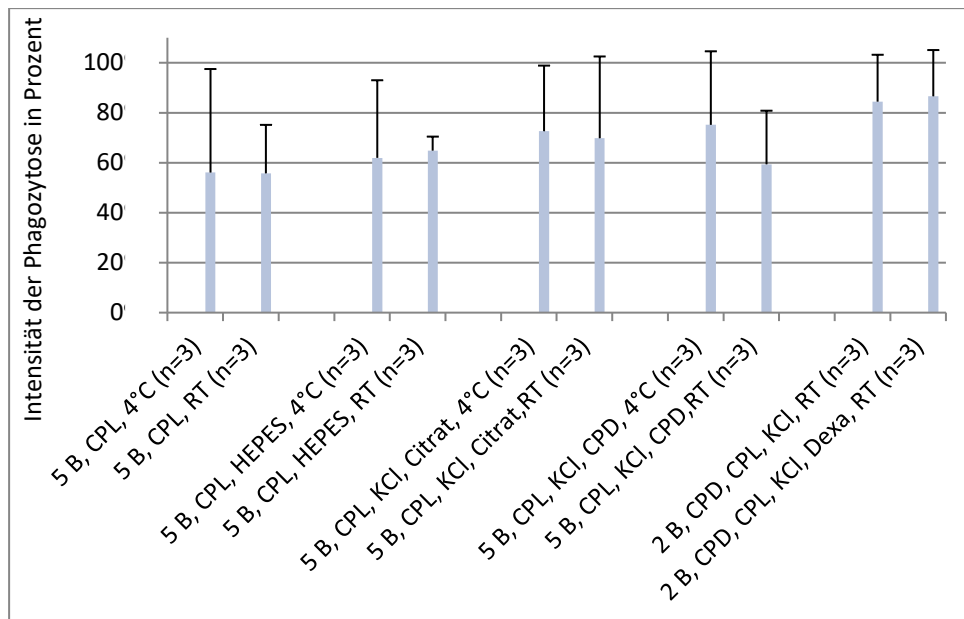
**Abb. 41: Intensität der Phagozytose in Prozent, bezogen auf den Buffy Coat nach 24 Stunden**  
**Abkürzungen:** **5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6/\text{ml}$ , **2**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7/\text{ml}$ , **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l).

Nach 24 Stunden kam es nur bei der Lagerung im Kühlschrank in CPD-Plasma zu einem Abfall der phagozytierenden Zellen unter 90% vom Ausgangswert, die andern Ansätze blieben über diesem Wert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Oxyburst, kam es bei den höher konzentrierten Zellen zu einem sehr niedrigen Anteil spontan aktiver Zellen. Signifikant höhere Spontanaktivitäten zeigten sich in den Ansätzen der 4. und 5. Versuchsreihe.

Bezogen auf die Intensität der Phagozytose ergaben sich nach 24 Stunden keine signifikanten Unterschiede. Im der Tendenz verhielten sich die höher konzentrierten und die in Citratplasma gelagerten Ansätze am stabilsten. Zu den stärksten Verlusten kam es bei der Lagerung mit HEPES.

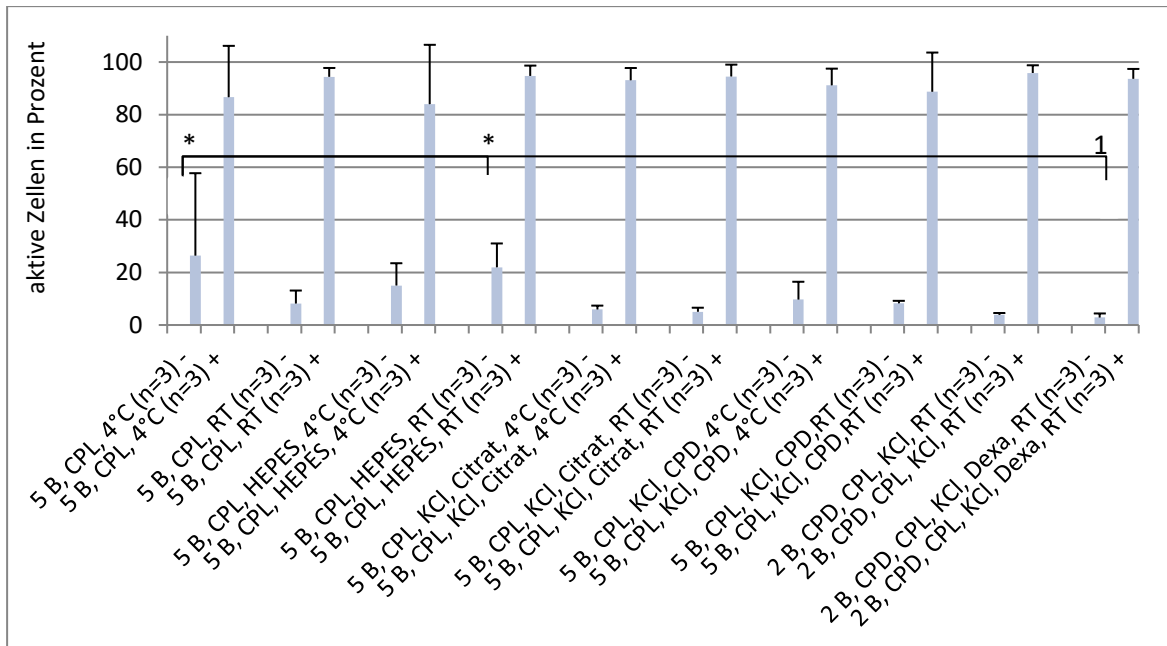


**Abb. 42: Anteil der an der Phagozytose beteiligten Zellen in Prozent ohne (-) und mit (+) Stimulation nach 48 Stunden. Abkürzungen:** **5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, **2**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l).

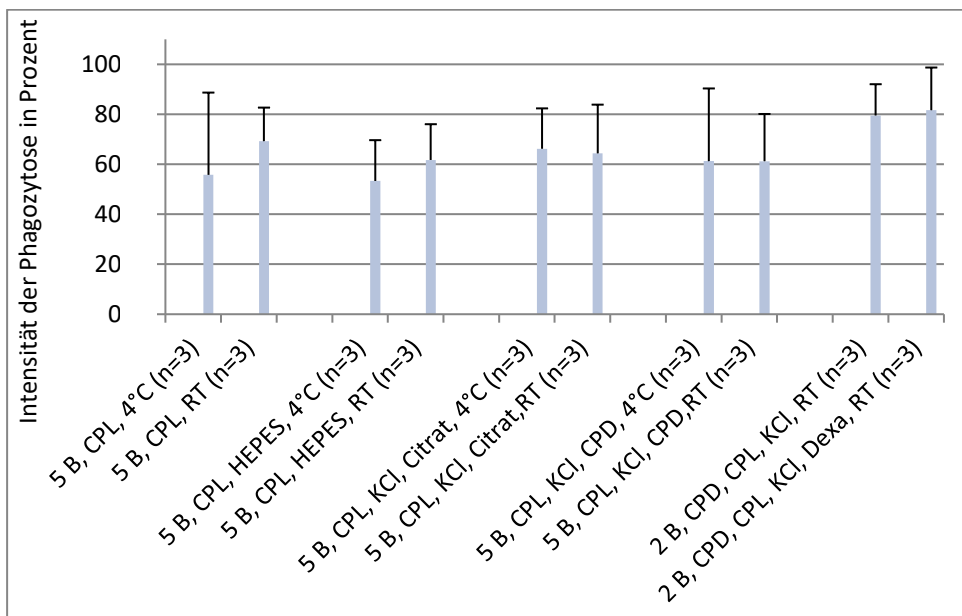


**Abb. 43: Intensität der Phagozytose in Prozent, bezogen auf den Buffy Coat nach 48 Stunden.**  
**Abkürzungen:** **5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, **2**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l).

Auch nach 48 Stunden waren bei Stimulation mit e-coli-Bakterien bis auf die bei 4°C gelagerten Zellen der 4. Versuchsreihe in allen Ansätzen noch über 90% der Zellen an der Phagozytose beteiligt. Der Anteil unstimuliert aktiver Zellen war in den hoch konzentrierten Ansätzen am niedrigsten und stieg in den Citrat- und CPD-Plasma Ansätzen leicht über 20 Prozent, die Unterschiede waren aber auf Grund der hohen Standardabweichung nicht signifikant. Auch hinsichtlich der Intensität der Phagozytose gab es wie nach 24 Stunden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ansätzen. Die Werte bewegten sich zwischen 56 und 87% vom Ausgangswert, mit durchschnittlich den höchsten Werten in den hoch konzentrierten Ansätzen und den niedrigsten bei den beiden Ansätzen ohne Zusätze der 4. Versuchsreihe.



**Abb. 44: Anteil der an der Phagozytose beteiligten Zellen in Prozent ohne (-) und mit (+) Stimulation nach 72 Stunden. Abkürzungen:** 5: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, 2: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l), **1**: Gruppe mit bestem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .



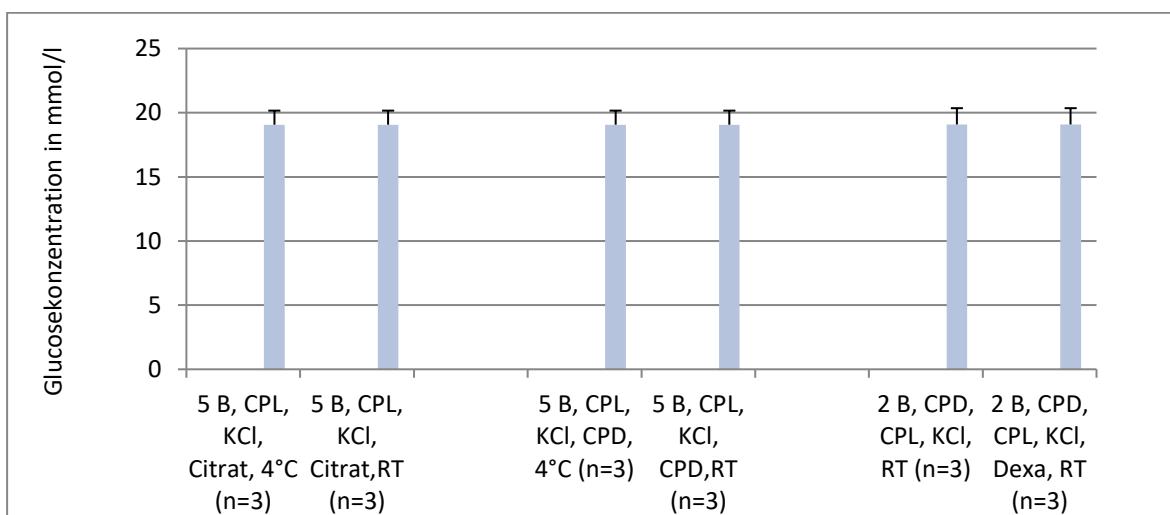
**Abb. 45: Intensität der Phagozytose in Prozent, bezogen auf den Buffy Coat nach 72 Stunden**  
**Abkürzungen:** 5: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, 2: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l).

Nach 72 Stunden bewegte sich der Anteil, der zur Phagozytose stimulierbaren Zellen zwischen 84 - 96%, ohne signifikante Unterschiede zwischen den Ansätzen. Erneut wiesen die am höchsten konzentrierten Zellen die geringste Spontanaktivität auf, signifikant waren die Unterschiede jedoch nur zwischen dem mit Dexamethason versetzten Ansatz und dem Ansatz ohne Zusätze bei 4°C bzw. dem Ansatz mit HEPES und Lagerung bei Raumtemperatur.

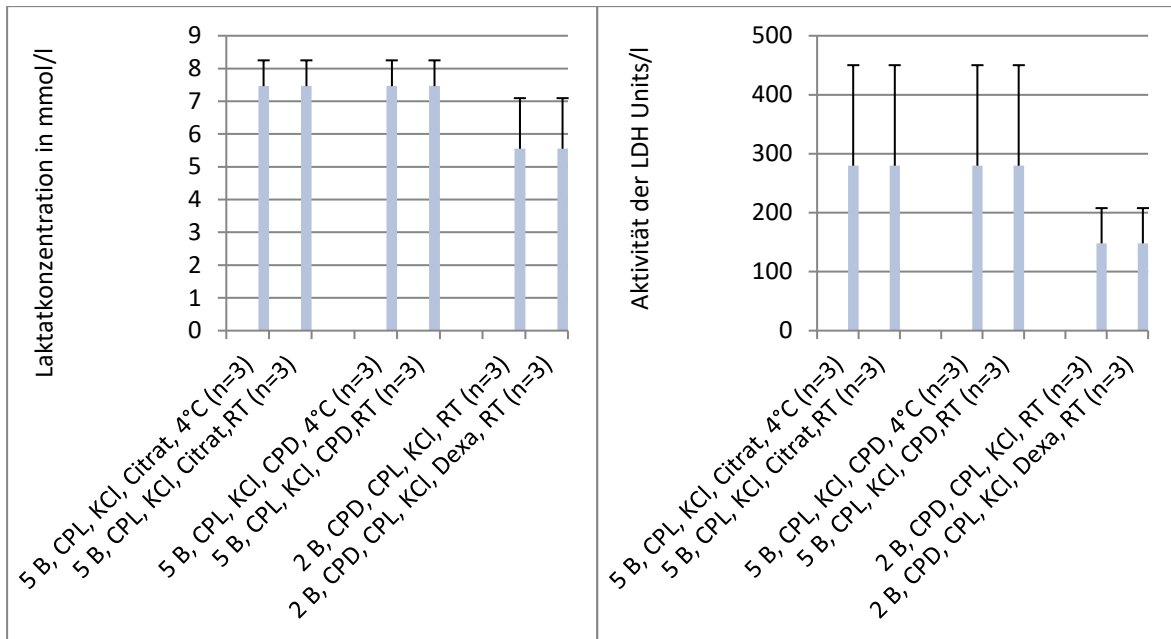
Die Intensität der Phagozytose nahm weiter ab und lag nach 72 Stunden zwischen 53 und 82% des Ausgangswertes. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren wiederum nicht signifikant, jedoch setzte sich der Trend mit den besten Ergebnissen bei den höher konzentrierten Ansätzen mit und ohne Dexamethason fort. Die bei 4°C ohne Zusätze oder in HEPES gelagerten Zellen erzielten erneut eher niedrige Werte.

#### 4.7 Glucose, Lactat und LDH über 72 Stunden

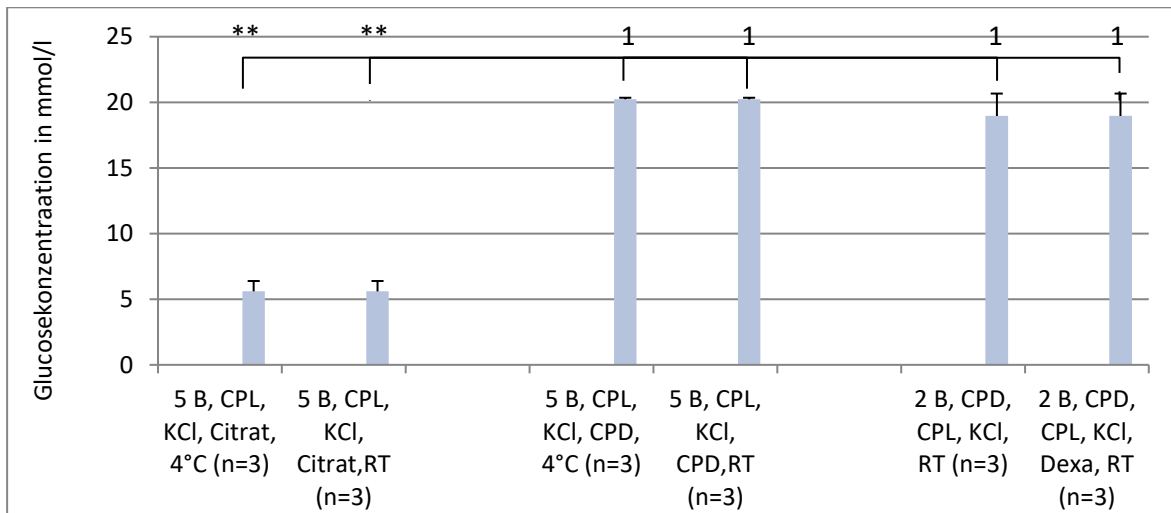
Die Bestimmung der Konzentrationen bzw. der Aktivitäten von Glucose, Lactat und der Lactatdehydrogenase wurden ab der 6. Versuchsreihe durchgeführt. Die Glucosespiegel lagen in den untersuchten Buffy Coats etwas unter 20 mmol/l, der Laktatspiegel bei 5,6 und 7,5mmol/l und die Aktivität der Lactatdehydrogenase durchschnittlich bei 280 und 150 Units/l.



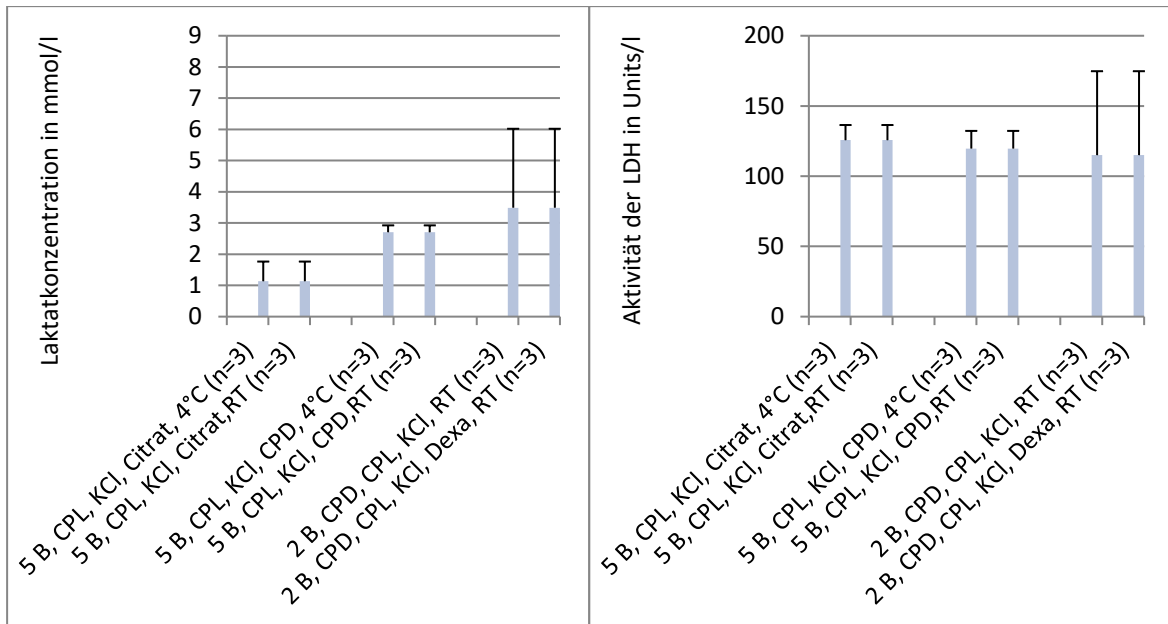
**Abb. 46: Glucosekonzentration in mmol/l im Buffy Coat. Abkürzungen:** **5:** Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, **2:** Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, **B:** Lagerung im Beutel, **RT:** Raumtemperatur, **CPL:** Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl:** Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat:** Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD:** Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa:** Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l).



**Abb. 47: Konzentration von Lactat in mmol/l und Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) in Units/l im Buffy Coat. Abkürzungen:** **5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, **2**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l).

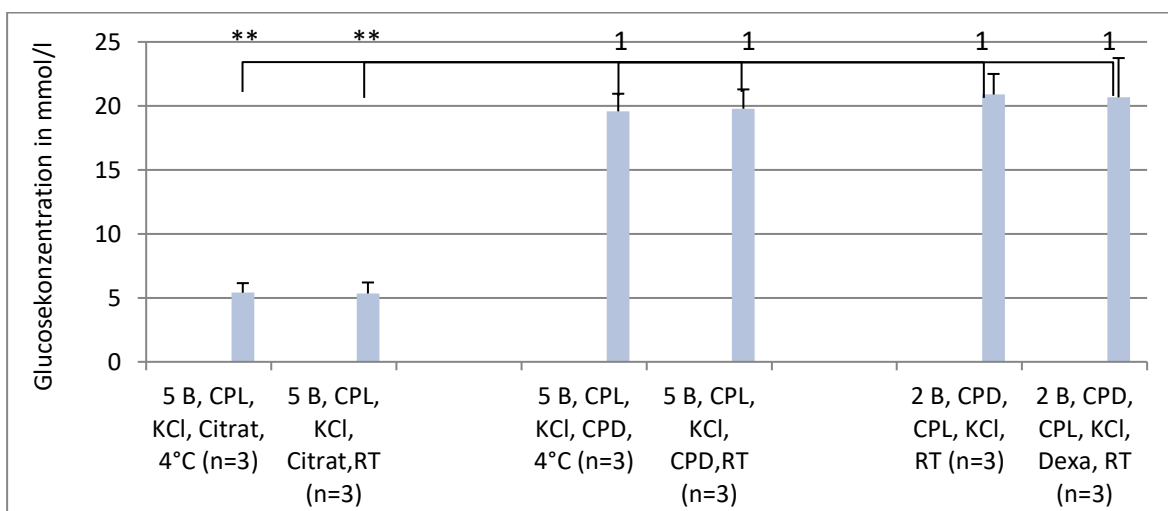


**Abb. 48: Glucosekonzentration in mmol/l im Plasma nach 0 Stunden. Abkürzungen:** **5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, **2**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l), **1**: Ansatz mit höchstem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

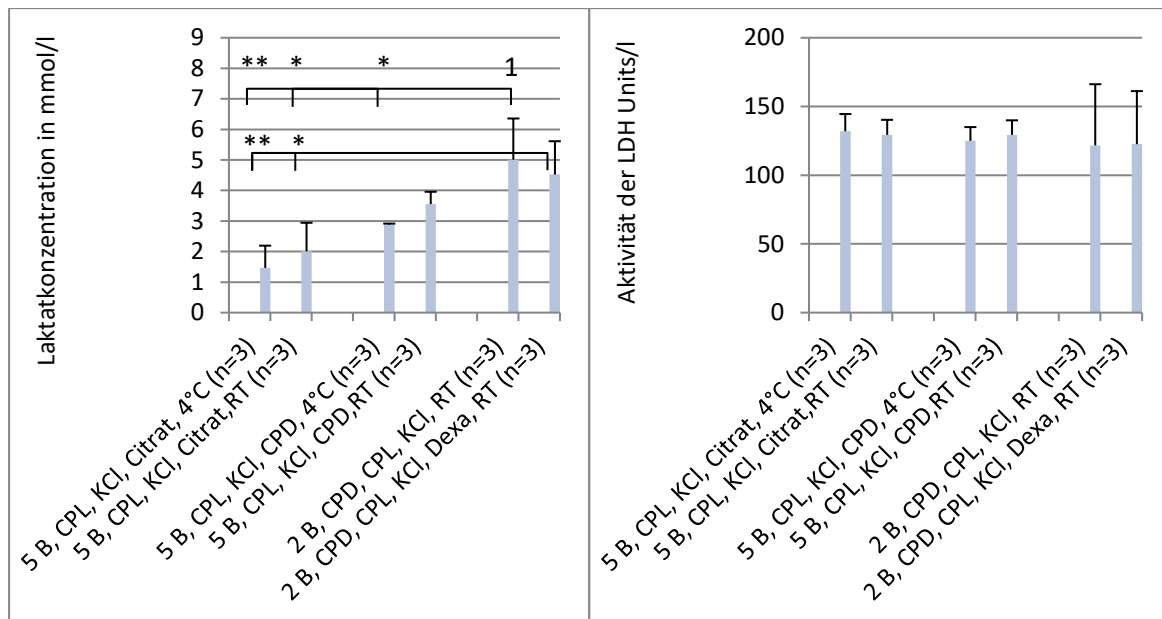


**Abb. 49: Konzentration von Lactat in mmol/l und Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) in Units/l im frischen Leukozytenkonzentrat. Abkürzungen:** 5: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, 2: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l).

Das zur Lagerung verwendete Citratplasma wies signifikant niedrigere Glucosespiegel als das CPD-Plasma auf. Der Lactatspiegel und die Aktivität der Lactatdehydrogenase bewegten sich bei allen Plasmen in einem ähnlichen Bereich.

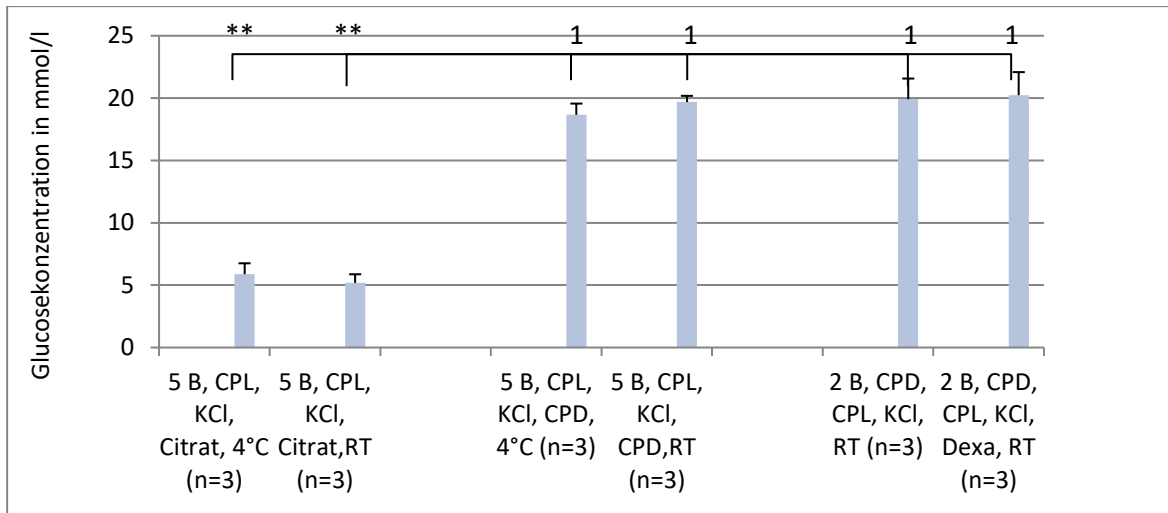


**Abb. 50: Glucosekonzentration in mmol/l nach 24 Stunden. Abkürzungen:** 5: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, 2: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l), **1**: Ansatz mit höchstem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

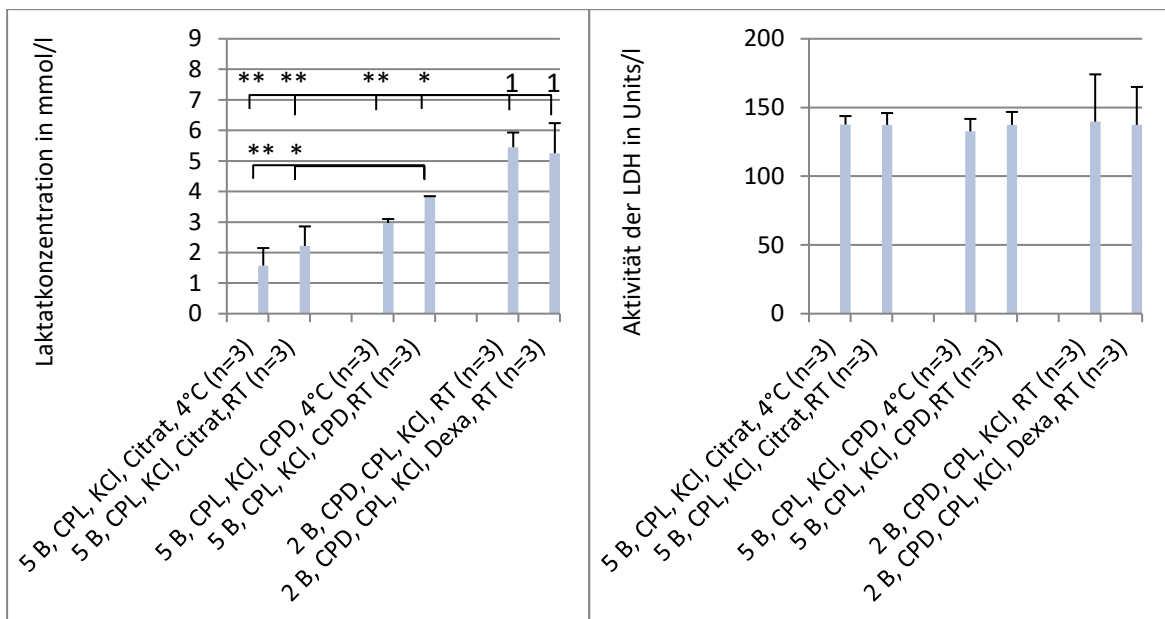


**Abb. 51: Konzentration von Lactat in mmol/l und Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) nach 24 Stunden.**  
**Abkürzungen:** **5:** Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, **2:** Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, **B:** Lagerung im Beutel, **RT:** Raumtemperatur, **CPL:** Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl:** Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat:** Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD:** Lagerung in CPD-Plasma, **Dexa:** Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l), **1:** Ansatz mit höchstem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

Nach 24 Stunden Lagerung war der Lactatspiegel in allen Ansätzen angestiegen. Am stärksten fiel der Anstieg bei den höher konzentrierten Zellen aus. Außerdem war der Anstieg jeweils (nicht signifikant) stärker bei Raumtemperatur und bei Lagerung in CPD-Plasma. Bei Zusatz von Dexamethason, fiel der Anstieg geringer aus, jedoch waren auch diese Unterschiede nicht signifikant. Die Aktivität der Lactatdehydrogenase hatte sich kaum verändert.



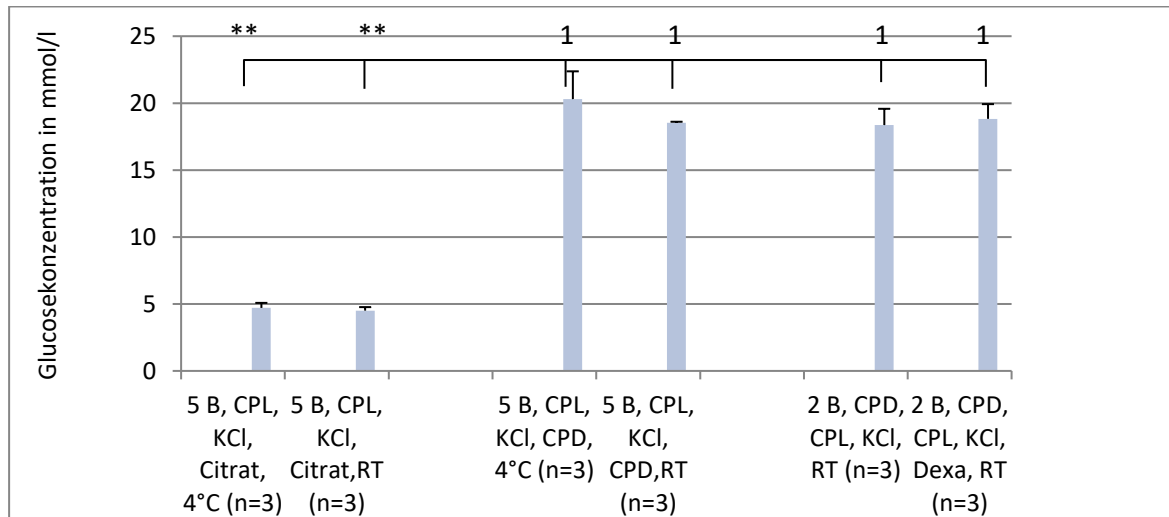
**Abb. 52: Glucosekonzentration in mmol/l nach 48 Stunden.** Abkürzungen: 5: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, 2: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, B: Lagerung im Beutel, RT: Raumtemperatur, CPL: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), KCl: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), Citrat: Lagerung der Zellen in Citratplasma, CPD: Lagerung in CPD-Plasma, Dexa: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l), 1: Ansatz mit höchstem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .



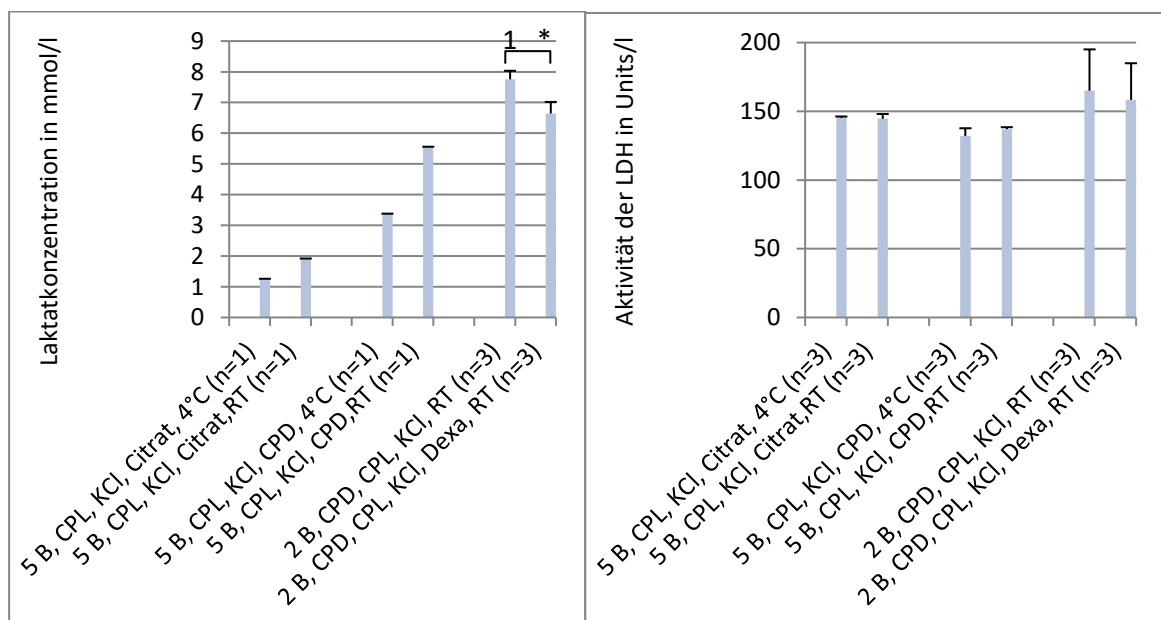
**Abb. 53: Konzentration von Lactat in mmol/l und Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) nach 48 Stunden.** Abkürzungen: 5: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, 2: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, B: Lagerung im Beutel, RT: Raumtemperatur, CPL: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), KCl: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), Citrat: Lagerung der Zellen in Citratplasma, CPD: Lagerung in CPD-Plasma, Dexa: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l), 1: Ansatz mit höchstem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

Nach 48 Stunden hatten sich, die schon nach 24 Stunden ersichtlichen Unterschiede zwischen den Ansätzen weiter verstärkt. Die hoch konzentrierten Zellen wiesen signifikant höhere Lactatspiegel als die anderen Ansätze auf. Auch die Unterschiede hinsichtlich

Temperatur und Art des Plasmas verstärkten sich. Hinsichtlich der Aktivität der Lactatdehydrogenase gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ansätzen bzw. den vorangegangenen Messungen.



**Abb. 54: Glucosekonzentration in mmol/l nach 72 Stunden.** Abkürzungen: **5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, **2**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexta**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l), **1**: Ansatz mit höchstem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .



**Abb. 55: Konzentration von Lactat in mmol/l und Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) nach 72 Stunden.** Abkürzungen: **5**: Konzentration weißer Blutzellen von  $5 \times 10^6$ /ml, **2**: Konzentration weißer Blutzellen von  $2 \times 10^7$ /ml, **B**: Lagerung im Beutel, **RT**: Raumtemperatur, **CPL**: Zugabe einer Citratpufferlösung (pH ca. 7,2), **KCl**: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), **Citrat**: Lagerung der Zellen in Citratplasma, **CPD**: Lagerung in CPD-Plasma, **Dexta**: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l), **1**: Ansatz mit höchstem Ergebnis, \*: signifikant im Vergleich zu 1,  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

Insgesamt kam es über die 72 Stunden in allen Ansätzen nur zu geringen Abfällen der Glucosekonzentration. Die Konzentration blieb im CPD-Plasma signifikant höher als im Citratplasma. Das Muster des stärkeren Anstieges der Lactatkonzentration bei höheren Temperaturen, höherer Konzentration und bei Lagerung in CPD-Plasma blieb über die Zeit bestehen. Auf Grund der kleinen Stichprobe konnten für die Versuchsreihen 6 und 7 jedoch keine Signifikanz berechnet werden. Die mit Dexamethason versetzten Zellen wiesen nach 72 Stunden signifikant niedrigere Lactatspiegel als die Vergleichsgruppe auf. Hinsichtlich der LDH zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Im Trend stieg die Aktivität bei Lagerung in Citratplasma etwas stärker an als in den CPD-Ansätzen, jedoch nicht so stark wie bei den höher konzentrierten Zellen. Im Vergleich kam es bei den höher konzentrierten Zellen mit Dexamethason zu einem geringeren Anstieg als in der Vergleichsgruppe.

#### 4.8 Elektronenmikroskopie

Während des letzten Durchgangs der 8. Versuchsreihe wurden nach Aufreinigung und alle 24 Stunden Proben der Leukozytenkonzentrate fixiert und elektronenmikroskopische Bilder erstellt, um einen Eindruck vom Zustand der Granulozyten im Verlauf der Lagerung zu gewinnen. Während die Zellen nach der Aufreinigung noch intakt wirken zeigen sich bereits nach 24 Stunden großflächig Netze die sich zwischen und um die Zellen erstrecken. Nach 48 Stunden fallen vermehrt Ausstülpungen in den Zellmembranen der Granulozyten auf. Eine Auswahl der Bilder ist im Folgenden zu sehen.

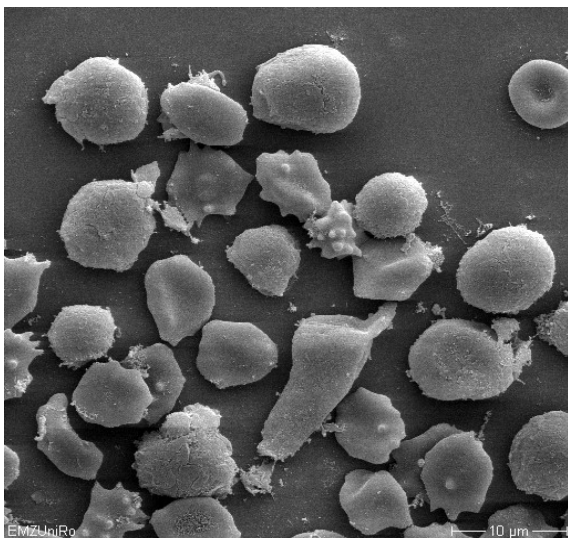


Abb. 56: LK direkt nach Aufreinigung.

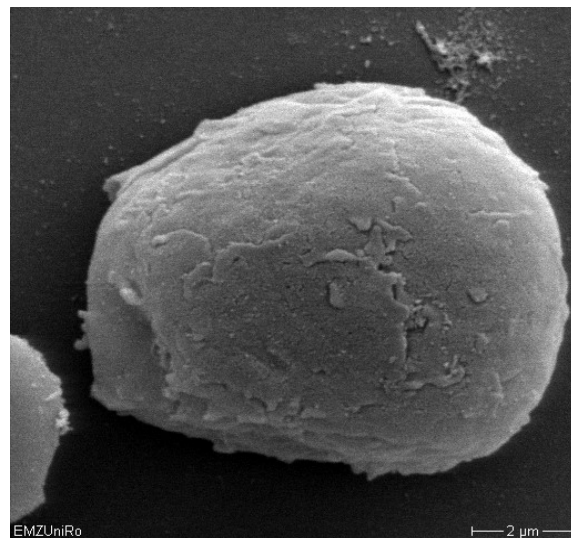
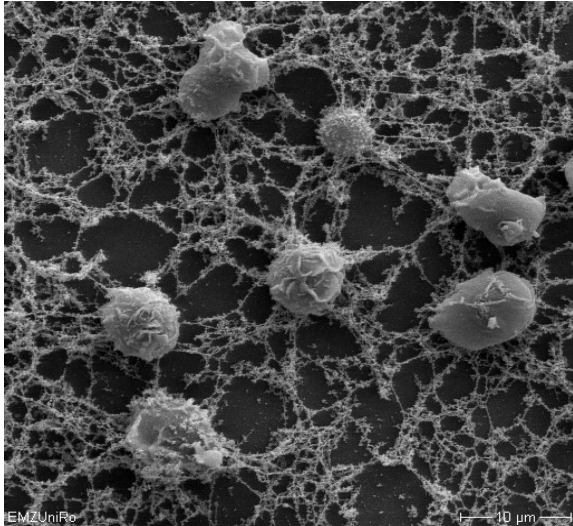
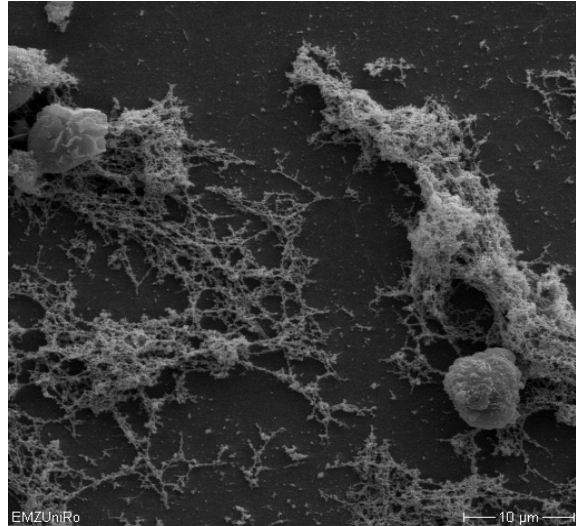


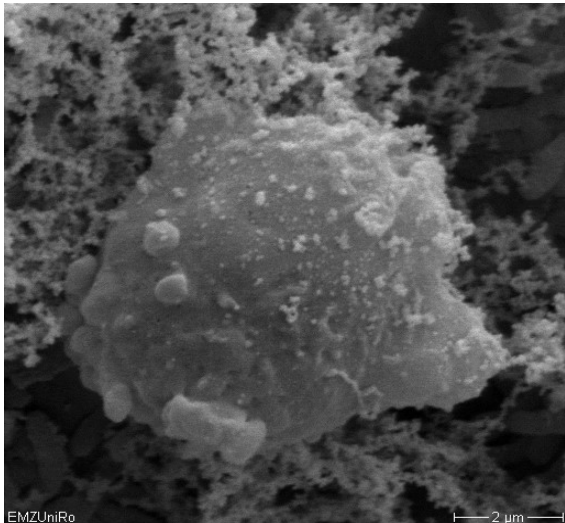
Abb.57: Granulozyt direkt nach Aufreinigung.



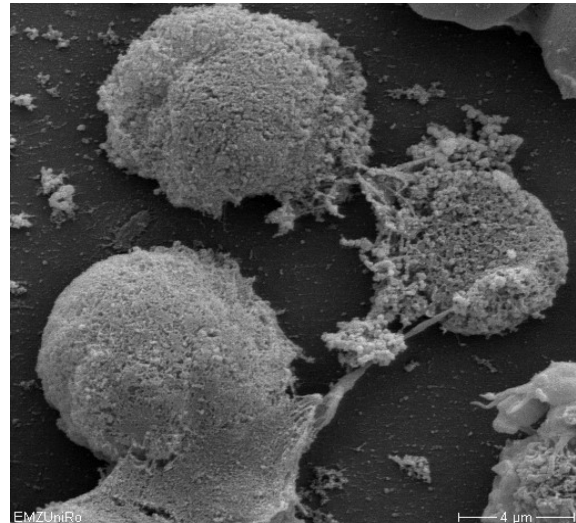
**Abb. 58: LK nach 24 Stunden ohne Dexamethason.**



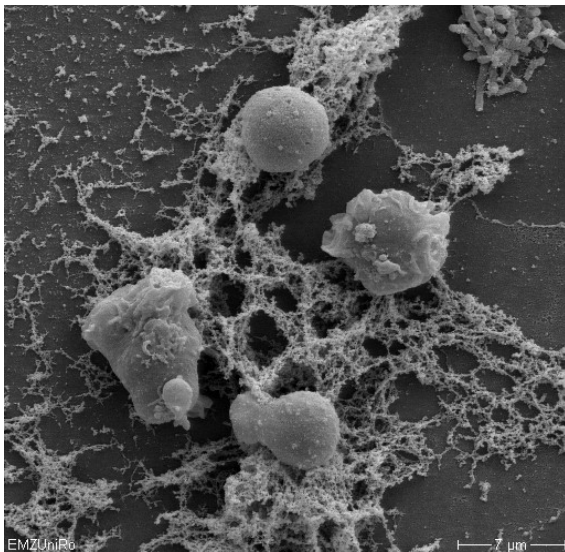
**Abb. 59: LK nach 24 Stunden mit Dexamethason.**



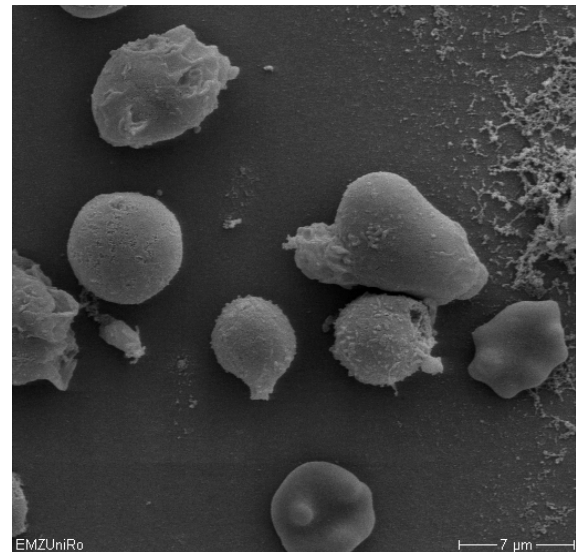
**Abb. 60: Granulozyt nach 48 Stunden.**



**Abb. 61: LK nach 48 Stunden mit Dexamethason.**



**Abb. 62: LK nach 72 Stunden.**



**Abb. 63: LK nach 72 Stunden (Dexamethason).**

## 4.9 Zusammenfassung

Insgesamt schnitt die Lagerung in Zellkulturflaschen mit luftdurchlässigen Filterkappen und dem einhergehenden Anstieg des pH-Wertes in allen Untersuchungen - besonders die Aktivität der Zellen betreffend - am schlechtesten ab und wurde durch die Lagerung in luftundurchlässigen Beuteln ersetzt. In Tabelle 9 sind noch einmal die 5 erfolgreichsten Lagerungsversuche aufgeführt mit den Ergebnissen der Messungen nach 72 Stunden. Für die in der Tabelle gelisteten Versuche wurde je nach Abschneiden in den einzelnen Untersuchungen (ausgenommen Laktat und pH-Werte) Plätze (1., 2., 3.... Platz) vergeben und die Zahlenwerte addiert - je niedriger der Zahlenwert, desto besser die Ergebnisse in den einzelnen Versuchen im Verhältnis zu den anderen Ansätzen.

**Tab. 9: Auflistung der 5 erfolgreichsten Lagerungsbedingungen von oben nach unten, mit den Ergebnissen der einzelnen Untersuchungen nach 72 Stunden. In Prozent angegebene Werte beziehen sich auf den Ausgangswert (frisches Leukozytenkonzentrat oder Buffy Coat [Phagozytose und Oxyburst]). Abkürzungen: Chemi: Chemilumineszenz, Oxy: Oxyburst, Phago: Phagozytose, RT: Raumtemperatur, CPL: Zugabe einer Citrat-Pufferlösung (pH ca. 7,2), KCl: Zugabe von Kaliumchlorid (Kaliumkonzentration zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l), Citrat: Lagerung der Zellen in Citratplasma, CPD: Lagerung in CPD-Plasma, Dexa: Zugabe von Dexamethason (Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l).**

Lagerung	Zellzahl	Vitalität	Chemi Lucigenin/ Luminol	Oxy	Phago	pH	Lactat
2x10 <sup>7</sup> gepoolte Zellen/ml, CPL, KCl, CPD, RT	95,3%	98,0%	78,0% 48,6%	112,1%	79,5%	7,2	7,8 mmol/l
2x10 <sup>7</sup> gepoolte Zellen/ml, CPL, KCl, CPD, RT, Dexa	92,9%	97,7%	62,6% 36,8%	110,5%	81,7%	7,3	6,6 mmol/l
5x10 <sup>6</sup> Zellen/ml, CPL, RT	94,7%	94,3%	53,5% 44,7%	36,0%	69,3%	7,6	n.a
5x10 <sup>6</sup> Zellen/ml, CPL, CPD, RT	96,3%	94,0%	79,6% 42,8%	33,9%	61,2%	7,5	5,6 mmol/l
5x10 <sup>6</sup> Zellen/ml, CPL, Citrat, RT	92,2%	93,0%	52,6% 41,3%	36,5%	64,4%	7,7	1,9 mmol/l

Insgesamt lässt sich feststellen, dass alle der 5 erfolgreichsten Ansätze bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden. Die Werte für Zellzahl und Vitalität bewegten sich nach 72 Stunden in allen 5 Ansätzen in sehr ähnlichen Bereichen und dabei immer deutlich über 90%. Bei der Bestimmung des Oxybursts zeigten sich große Schwankungen zwischen der Messung mit Lucigenin und Luminol aber auch zwischen den durchflusszytometrischen und den Ergebnissen der Chemilumineszenz. Die hoch konzentrierten Zellen erzielten besonders

bei den durchflusszytometrischen Aktivitätsbestimmungen deutlich höhere Ergebnisse als die anderen Ansätze. Der Lactatspiegel lag jedoch bei ihnen höher und der pH-Wert niedriger.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Ergebnisse der Aufreinigung**

Insgesamt konnten mit der erfolgreichsten Aufreinigungsmethode (Buffy Coat und HES im Verhältnis 2:1) aus 50-70ml Buffy Coat durchschnittlich  $0,95 \times 10^9$  weiße Blutzellen, davon  $0,61 \times 10^9$  neutrophile Granulozyten gewonnen werden. Um eine ausreichende Anzahl von  $2-4 \times 10^{10}$  Granulozyten (46) für die therapeutische Verwendung zu erreichen, würden nach den vorliegenden Ergebnissen mindestens 33 Buffy Coats benötigt. Ähnliche Mengen an Leukozyten konnten auch in Studien von Mochizuki und Akaihata gewonnen werden. Durch ein Aufreinigungsverfahren in Polyvinylchlorid-Beuteln entstanden aus 200 ml Vollblut ca. 75ml Granulozytenkonzentrat. Der Anteil an Granulozyten bei nicht vorstimulierten Spendern betrug dabei  $0,6 \times 10^9$  beziehungsweise  $0,8 \times 10^9$  Zellen. Bei Vorstimulierung der Spender mit Dexamethason und/oder G-CSF konnten 6-8 Mal höhere Konzentrationen an Granulozyten gewonnen werden (82, 83). Der Anteil der Lymphozyten reduzierte sich bei unseren Versuchen durch die Aufreinigung um knapp 80% auf durchschnittliche Werte um  $0,2 \times 10^9$  Zellen. Die Reduzierung möglichst vieler Lymphozyten kann als positiv gewertet werden, da die Zellen im Falle einer Granulozytentransfusion für negative Reaktionen beim Empfänger verantwortlich gemacht werden. Dazu zählen über die Ausschüttung von Interleukin 8 das akute Transfusionsassoziierte Lungenversagen (84, 85). Interleukin 1 und 6 werden als Ursache für febrile Reaktionen vermutet (86) und es wurden nach Transfusionen von Granulozytenkonzentraten Alloimmunisationsraten zwischen 24 und 78 Prozent beschrieben (87, 88, 89). Weiterhin wird die Bestrahlung von Granulozytenkonzentraten zur Verhinderung der durch Lymphozyten verursachten Graft-versus-Host-Disease empfohlen (90). Mochizuki weist signifikant höhere Spiegel von Interleukin 8 bei den Zellen vorstimulierter Spender nach und erklärt dies mit einer höheren Zahl an Lymphozyten als in der Kontrollgruppe. Auch Interleukin  $1\beta$ , 6 und  $TNF\alpha$  werden überwiegend durch Lymphozyten ausgeschüttet (82).

Der in unseren Versuchen festgestellte Anstieg der absoluten Zellzahlen der Monozyten nach der Aufreinigung (teilweise lag die Anzahl der Monozyten nach der Aufreinigung doppelt so hoch wie davor) spricht für eine fehlerhafte Messung dieser Zellen nach dem Aufreinigungsverfahren. Eventuell wurden morphologisch veränderte Lymphozyten oder Granulozyten als Monozyten von dem Messgerät fehlinterpretiert.

In Hinblick auf die Reduktion von Erythrozyten und Thrombozyten erwies sich das hier verwendete Aufreinigungsverfahren als sehr effektiv. Die roten Blutkörperchen konnten ausgehend vom Buffy Coat um über 99%, die Plättchen um 95% reduziert werden. Bashir beschrieb 2008 die Anzahl von Erythrozyten, Neutrophilen, Lymphozyten und Plättchen in verschiedenen hergestellten Granulozytenkonzentraten. Dazu verglich er einzelne Buffy Coats mit Granulozytenkonzentraten aus 10 gepoolten und mit Plättchenlösung aufgereinigten Buffy Coats sowie mit Konzentraten, die durch Apherese mit und ohne vorherige Stimulation durch G-CSF gewonnen wurden. In der folgenden Tabelle werden die Ergebnisse dieser Arbeit mit denen von Bashir verglichen.

**Tab. 10: Zellzahlen von Erythrozyten, neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Plättchen in verschiedenen hergestellten Leukozytenkonzentraten, Daten sind als Median angegeben, die Werte der Zeilen 2-5 stammen von Bashir et al 2008 (91).**

	Erythrozyten x10 <sup>9</sup>	Neutrophile x10 <sup>9</sup>	Lymphozyten x10 <sup>9</sup>	Plättchen x10 <sup>9</sup>
1 aufgereinigter Buffy Coat, Reichert	1,1	0,61	0,2	3,4
1 aufgereinigter Buffy Coat, Reichert x10	11	6,1	2	34
1 aufgereinigter Buffy Coat, Bashir	270	1,1	0,99	72
10 aufgereinigte und gepoolte Buffy Coats, Bashir	570	8,8	6,29	344
Apherese ohne G-CSF, Bashir	680	6,3	5,95	105
Apherese + G-CSF , Bashir	300	63,7	n.a	160

Bei Bashir war die Anzahl an neutrophilen Granulozyten in den gepoolten Granulozytenkonzentraten etwas niedriger als in 10 einzelnen Buffy Coats zusammengenommen, jedoch 30% höher als in Konzentraten, die durch Apherese gewonnen wurden. Auch die Kontamination mit roten Blutzellen war in den gepoolten Buffy Coats etwas niedriger (91). Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in dieser Arbeit auf 10 Buffy Coats hochgerechnet lag vergleichbar mit den Ergebnissen nach Apherese jedoch um 31% niedriger als bei Bashirs gepoolten Buffy Coats. Auch lag die Konzentration an Lymphozyten (3x), Erythrozyten (62x) und Plättchen (3x) niedriger als in den durch Apherese gewonnenen Konzentraten und ca. 3x (Lymphozyten), 52x (Erythrozyten) und 10x (Plättchen) niedriger als in den gepoolten Buffy Coats von Bashir. Jedoch führte Bashir zur Aufreinigung auch nur ein einmaliges Spülen und anschließendes

Zentrifugieren mit Plättchenlösung durch, so dass diese Unterschiede zu erwarten waren. Wie bei den Versuchen von Mochizuki konnte auch Bashir durch die Stimulation mit G-CSF deutlich höhere Mengen an neutrophilen Granulozyten gewinnen, in diesem Fall 10x höhere Zellzahlen.

## 5.2 Entwicklung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde automatisch mit Hilfe des Sysmex bestimmt. Die Bestimmung der Leukozytenuntergruppen führte jedoch nach der Aufreinigung vermutlich zu fehlerhaften Messungen, insbesondere zu falsch hohen Monozytenzahlen und in dieser Folge vermutlich auch zu falsch niedrigen Werten für die Lymphozyten beziehungsweise die neutrophilen Granulozyten. Andere Möglichkeiten zur genaueren Bestimmung der einzelnen Fraktionen wären die Messung mit einem elektronischen Coulter Counter, wie in zahlreichen anderen Studien verwendet (82, 87, 92 - 94) sowie die Immunphänotypisierung der Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie (83). In dieser Arbeit kam es über die Lagerungsdauer von 72 Stunden in den erfolgreichsten Ansätzen nur zu sehr geringen Verlusten hinsichtlich der Zahl weißer Blutzellen. Insgesamt bewegten sich die Verluste zwischen 4 und 32% vom Ausgangswert. Bei allen in Beuteln und bei Raumtemperatur gelagerten Zellen lagen die Verluste sowohl bei einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml als auch  $2 \times 10^7$  Zellen/ml bei maximal 10%. Bis auf eine Versuchsreihe zeigten die bei 4°C gelagerten Zellen keine signifikant schlechteren Ergebnisse als die bei Raumtemperatur gelagerten Konzentrate. Die Lagerung bei 37°C erwies sich ab den in Beuteln gelagerten Versuchsreihen als signifikant schlechter in Bezug auf die Anzahl weißer Blutzellen. Bei anderen Untersuchungen zum Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Zellzahl ergaben sich keine eindeutigen Ergebnisse. Bei Lane, die aus Vollblut gewonnene Granulozyten in Konzentrationen von ca.  $3,3 \times 10^7$  Zellen/ml in CPD-Plasma lagerte, also unter sehr ähnlichen Bedingungen wie in dieser Arbeit, zeigten sich nach 48 und 72 Stunden bei der wärmeren Lagerungstemperatur von 24°C deutliche stärkere Zellverluste als bei 6°C. Konkret lagen die Verluste nach 48 Stunden bei 19 und 27% vom Ausgangswert und nach 72 bei 26 und 42% vom Ausgangswert (95). Hubel hingegen verglich die Lagerung hochkonzentrierter ( $2 \times 10^8$  Zellen/ml), durch Stimulierung der Spender mit G-CSF gewonnener Zellen bei Temperaturen von 10 und 22°C mit und ohne Zugabe von G-CSF. Sowohl in Hinblick auf die Lagerungstemperatur als auch auf die Zugabe von G-CSF ließen sich nach 48 Stunden

keine signifikanten Unterschiede in den Auswirkungen auf die Zahl der weißen Blutzellen ausmachen. Die Zellzahl hatte sich insgesamt nur sehr wenig um Werte zwischen 1 und 5% vom Ausgangswert reduziert (94). Beschriebene Nachteile der Lagerung bei 4°C stellen ein stärkerer Verlust der Fähigkeit zur Chemotaxis (87, 96) sowie eine Tendenz der Zellen zur spontanen Aggregation und zur vermehrten Adhärenz an Endothelzellen bei kühleren Lagerungstemperaturen in vitro dar (97). Auch in dieser Arbeit wurden während der Lagerung bei 4°C Agglutinationen der Zellen festgestellt, diese verschwanden jedoch, nachdem für die Lagerung der Zellen Plasma verwendet wurde, das kurz nach dem Auftauen bei ca. 4°C für 5 Minuten bei 3000g zentrifugiert wurde. Nur der Überstand wurde für die Lagerung der Granulozyten verwendet. Hinsichtlich der Glukosekonzentration wiesen die in CPD-Plasma gelagerten Ansätze nach 72 Stunden etwas höhere Zellzahlen als die in Citratplasma gelagerten Zellen auf; die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant, so dass kein Vorteil für die Lagerung in einer höheren Glucosekonzentration bewiesen werden konnte. Möglicherweise könnte bei der Lagerung in höheren Zellkonzentrationen jedoch auch eine höhere Glukosekonzentration von Vorteil sein. Lightfoot untersuchte 2000 die Auswirkungen der Art der Vorstimulierung der Spender und verschiedener Verdünnungsstufen in autologem Plasma und 2001 die Wirkung verschiedener Lagerungsmedien auf die Granulozyten. Bei Stimulierung der Spender mit Dexamethason (+ G-CSF) kam es nach 48 Stunden zu signifikant stärkeren Abfällen der weißen Blutzellen, die Verluste lagen zwischen 18 und 11% im Vergleich zu 7% vom Ausgangswert bei Vorstimulierung allein mit G-CSF. Die Verdünnung in autologem Plasma wirkte sich bei Mobilisierung mit Dexamethason teilweise positiv auf die Zellzahlen aus. Bei Mobilisierung mit Dexamethason und G-CSF zeigten sich durch Verdünnung jedoch keine positiven Effekte auf die Zellzahl (92). Die Lagerung in Zellkulturmedien zeigte positive Auswirkungen sowohl auf die Zellzahl, als auch auf die Vitalität und den pH-Wert, jedoch sind diese Medien nicht zur Verwendung in vivo geeignet. Verdünnung in Plasma-Lyte A und Normosol R, die zur Verwendung in vivo zugelassen sind, verschlechterten Zellzahlen und Vitalität deutlich. Die Zugabe von Histidin, HEPES und Albumin zu Plasma-Lyte A führt jedoch zu einer Verbesserung. Als effektiv erwies sich auch die achtfache Verdünnung in einer Lösung aus Ringer Laktat, Albumin und Histidin (LRAH) mit einem Verlust weißer Blutzellen von 12 Prozent des Ausgangswertes nach 48 Stunden (93).

### 5.3 Vitalität

Der Anteil vitaler Zellen wurde mit Hilfe des Trypanblau-Testes unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Vorteile dieser Methode sind die schnelle und einfache Anwendung. Nachteile sind zum einen die Abhängigkeit vom Untersucher und das Risiko falschpositiver (nur vorübergehend gestörte Membranpermeabilität) und falschnegativer (geringe Mengen aufgenommenen Farbstoffes werden unter dem Lichtmikroskop nicht erkannt) Ergebnisse. Bei Verwendung eines fluoreszierenden Farbstoffes und der Untersuchung mit dem entsprechenden Mikroskop werden daher mehr avitale Zellen erkannt. Genauere Ergebnisse können mit der durchflusszytometrischen Bestimmung der Propidiumiodidaufnahme erzielt werden (98, 99). Eine weitere Methode, die auf dem Prinzip der Exklusion eines Farbstoffes bei intakter Zellmembran aufbaut ist der Test mit 7-Amino Aktinomycin D (7-AAD) (100). Mit Fluorescein Diazetat (FDA), das von vitalen Zellmembranen aufgenommen werden kann und im Zellinneren zu einem fluoreszierendem Stoff metabolisiert wird und Propidiumiodid können im Durchflusszytometer vitale und avitale Zellen gleichzeitig bestimmt werden (100, 101, 102). Eine weitere etablierte Möglichkeit zur Erkennung apoptotischer Zellen stellt die Bestimmung von Oberflächenantigenen wie CD16 und Annexin V dar (100). Annexin V gilt als früher Marker für die Apoptose und korreliert stark mit morphologischen Zeichen des programmierten Zelltodes (83, 103, 104). In dieser Arbeit konnten bei Lagerung mit einer Zellkonzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml nach 72 Stunden die höchsten Vitalitätswerte erzielt werden, sie lagen bei 97 und 98 Prozent. Auch ein Großteil der anderen Ansätze wies nach 72 Stunden noch über 90 Prozent vitale Zellen auf. Am schlechtesten schnitt die Lagerung in Zellkulturflaschen bei 4°C und Raumtemperatur und in Beuteln bei 37°C ab, hier bewegten sich die Werte zwischen 78 und 89 Prozent vitaler Zellen. Im direkten Vergleich führte die Zugabe von HEPES oder die Lagerung in Glukose-reicherem CPD-Plasma zu leichten jedoch nicht signifikanten Verbesserungen der Vitalität. Auch hier gilt, wie im Falle der Zellzahl, dass sich Unterschiede hier eventuell erst bei höheren Zellkonzentrationen bemerkbar machen könnten. Auch in anderen Studien konnten bei durch überwiegend von vorstimulierten Spendern gewonnenen Granulozytenkonzentraten hohe Anteile vitaler Zellen nach 44, 48 beziehungsweise 72 Stunden nachgewiesen werden. Bei Lightfoot über 90% nach 48 Stunden (92), bei Mochizuki über 94% nach 72 Stunden (82), beziehungsweise waren über 80% der Zellen Annexin V negativ (83). Auch Bashir berichtete nach 44 Stunden Lagerung von annähernd gleichen Vitalitätswerten, wie in frischen Granulozytenkonzentraten oder Buffy Coats (91) und Lightfoot beschrieb nach

48 Stunden Lagerung Anteile vitaler Zellen über 94% bei Verdünnung (ca.7:1) und Lagerung in den Kulturmedien DMEM, IMDM, X-VIVO 10 und LRHA nach Mobilisierung mit G-CSF und Dexamethason. Bei Lagerung in Plasma Lyte A und Normosol R lagen die Werte unter 90% (93). Zwischen 81 und 92% vitale Zellen nach 48 Stunden wies Lightfoot 2000 bei Lagerung in autologem Plasma nach zweifacher Verdünnung nach, wobei die mit Dexamethason und mit Dexamethason und G-CSF mobilisierten Zellen höhere Werte als die allein mit G-CSF mobilisierten Zellen aufwiesen (92). Die schlechten Ergebnisse der in Flaschen gelagerten Zellen lassen sich wahrscheinlich aus den starken Anstiegen der pH-Werte bei dieser Lagerungsmethode erklären. Die bei 37°C gelagerten Zellen hatten in dieser Hinsicht einen Vorteil, da sie im CO<sub>2</sub>-Brutschrank gelagert wurden und ihr pH-Wert im physiologischen Bereich konstant gehalten wurde. Mit dem Wechsel auf die Lagerung in luftundurchlässigen Beuteln fiel dieser Vorteil weg und die Zellen erzielten schlechtere Vitalitätswerte als die bei 4°C und Raumtemperatur gelagerten. Es wurde berichtet, dass Dexamethason, Methylprednisolon und Hydrocortison über 48 Stunden signifikant den Anteil apoptotischer Granulozyten reduzieren konnten (105). Die Ergebnisse konnten bei dieser Arbeit nicht bestätigt werden, auch in Hinblick auf die Zellzahl zeigte sich kein Vorteil für die mit Dexamethason versetzten Zellen. Jedoch wären zur genaueren Bestimmung der Anzahl apoptotischer Zellen wie vorher bereits diskutiert genauere Nachweismethoden, wie die Bestimmung von Oberflächenantigenen, oder die durchflusszytometrische Bestimmung der Propidiumiodid- und Fluorescein Diazetat-Aufnahme besser geeignet.

#### **5.4 pH-Wert**

Die Stabilisierung des pH-Wertes scheint besondere Wichtigkeit für die Fähigkeit der Zellen zur Chemotaxis zu besitzen, die sehr sensibel auf pH-Schwankungen reagiert (106, 107, 108). Die Lagerung in Zellkulturflaschen mit luftdurchlässigen Filterkappen führte, außer im CO<sub>2</sub>-Brutschrank, zu einem starken Anstieg der pH-Werte. Auf Grund dessen und der Tatsache, dass der Anstieg bei Lagerung in luftundurchlässigen Beuteln deutlich geringer ausfiel, ist zu vermuten, dass der Anstieg durch den Verlust von CO<sub>2</sub> bedingt wurde. Der Zusammenhang zwischen Gaspermeabilität des Lagerungsbehältnisses und dem Verhalten des pH-Wertes wurde bereits von Eriksson beschrieben. So kam es bei geringer Durchlässigkeit für CO<sub>2</sub> zu einem stärkeren Abfall des pH-Wertes bei der Lagerung von aufbereiteten Buffy Coats (109). Eventuell könnte neben der Zugabe von

Puffersubstanzen auch die Wahl von Behältnissen mit höherer Gaspermeabilität die Lagerung der Granulozyten in höherer Konzentration ermöglichen. Unter Zugabe von HEPES konnte bei einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml der Anstieg des pH-Wertes während der Lagerung reduziert werden, was sich jedoch nicht positiv auf die Funktionalität der Zellen auszuwirken schien. Generell stellt für die praktische Anwendung von Granulozytenkonzentraten eher der Abfall des pH-Wertes bei Lagerungskonzentrationen über  $2 \times 10^7$  Zellen/ml ein Problem dar. Besonders bei den hochkonzentrierten, nach Stimulierung mit G-CSF und Glukokortikoiden gewonnenen Konzentraten kam es in Studien ohne Verdünnung zu starken Abfällen der pH-Werte (87, 92). Lightfoot stellte fest, dass bei Lagerung in autologem Plasma die Konzentrationen bei  $1,7 \times 10^7$  Zellen/ml (Mobilisierung der Granulozyten mit Dexamethason, Verdünnung 1:8) beziehungsweise  $2 \times 10^7$  Zellen/ml (Mobilisierung mit Dexamethason und G-CSF, Verdünnung 1:16) liegen sollte, um einen Abfall des pH-Wertes unter 7,1 zu vermeiden. Ohne Verdünnung bewegten sich die Werte nach 48 Stunden zwischen 5,4 und 5,9 (92). Auf der Suche nach einem Medium mit positiven Effekten auf die Stabilisierung des pH-Wertes erwiesen sich in weiteren Untersuchungen von Lightfoot die Kulturmedien DMEM und IMEM als am erfolgreichsten. Lightfoot merkte jedoch an, dass diese Substanzen nicht für die Anwendung in vivo zugelassen sind und schlug daher die Lagerung in Ringer Laktat oder Plasma-Lyte A Lösungen mit Zugabe von Puffersubstanzen und Albumin vor (93). Die Arbeitsgruppe um Schwanke verglich 2005 die Lagerung von Granulozyten in den für Thrombozyten verwendeten Medien T-Sol mit und ohne HSA und in autologem Plasma, wobei die besten Ergebnisse hinsichtlich des pH-Wertes bei Lagerung in autologem Plasma bei einer Verdünnung von 1:8 und 1:4 erreicht wurden; hier stabilisierte sich der Wert bei leicht über (1:8) beziehungsweise unter (1:4) 7 (87). In Untersuchungen von Mochizuki, der unverdünnte Granulozytenkonzentrate von vorstimulierten Spendern (G-CSF mit und ohne Dexamethason) in Beuteln mit Heparin/Natrium lagerte, lagen die pH-Werte auch bei Granulozytenkonzentrationen von  $4,6 \times 10^7$ /ml und  $6,5 \times 10^7$ /ml nach 72 Stunden bei Werten von ca. 7,0 und 6,9. Die Zellen der Kontrollgruppe (unstimulierte Spender) wiesen bei einer Konzentration von  $0,8 \times 10^7$  Zellen/ml ebenfalls einen pH von ca. 7,0 auf, zeigten also keine Unterschiede zu den höher konzentrierten Zellen der mit G-CSF (+ Dexamethason) stimulierten Spender (82).

## 5.5 Chemilumineszenz

Die Chemilumineszenz gilt als sensitives Assay für die Bestimmung des Oxyburst (110, 111, 112). Durch die Messung mit Luminol und Lucigenin werden extrazelluläre Sauerstoffradikale nachgewiesen (100). Lucigenin wird jedoch auch zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies an Mitochondrien verwendet (113). Die Intensität der Lumineszenz ist proportional zur Anzahl der Reaktionen (80) und gibt damit einen guten Eindruck über die Intensität mit der die Zellen Radikale ausschütten. Jedoch kann Lucigenin auch selber zu Radikalbildung führen, was zu einer Beeinflussung der Ergebnisse führen kann (114, 115). Auch in dieser Arbeit lagen die mit Lucigenin ermittelten Werte für die Chemilumineszenz jeweils höher als die mit Luminol bestimmten.

Während der Bestimmung der Chemilumineszenz zeigten die in Flaschen gelagerten Zellen, bei denen es zu starken Anstiegen der pH-Werte kam, die schlechtesten Ergebnisse. Ebenfalls schlecht schnitt die Lagerung in Beuteln bei 37°C ab. Die genannten Ansätze zeigten bereits nach 24 Stunden Verluste von 20-60% ihrer Ausgangsaktivität. Nach 48 Stunden nahm die Aktivität weiter ab und lag bei der Messung nach 72 Stunden bei allen Ansätzen bei unter 20% des Ausgangswertes. Insgesamt schnitten nach Umstieg auf die Beutellagerung die bei Raumtemperatur aufbewahrten Zellen ab den Messungen bei 48 Stunden signifikant besser als die bei 37°C und auch besser als die bei 4°C gelagerten Zellen ab, teilweise waren die Unterschiede jedoch nicht signifikant. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von denen Hubels, der nach 48 Stunden und bei Messung mit Luminol höhere Werte für die Chemilumineszenz bei 10°C im Vergleich zu Lagerung bei 22°C nachwies. Weiterhin lag bei Hubel die induzierte Chemilumineszenz bei beiden Temperaturen nach 24 und 48 Stunden jeweils höher als bei der ersten Messung. Die Spender waren jedoch mit G-CSF stimuliert und die Zellen wurden in wesentlich höheren Konzentrationen von  $2 \times 10^8$  Zellen/ml gelagert (94). Die Zugabe von HEPES führte sowohl bei 4°C als auch bei Raumtemperatur nicht zu einer Verbesserung der Funktionalität. Hinsichtlich der Glucosekonzentration zeigte sich bei Messung mit Lucigenin bei Raumtemperatur sowohl nach 48 als auch nach 72 Stunden ein Vorteil für die in CPD-Plasma gelagerten Zellen. Bei Messung mit Luminol zeigten sich für beide Temperaturen keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der Chemilumineszenz. Die mit Dexamethason versetzten Zellen wiesen insgesamt bei allen Messungen niedrigere Werte auf. Möglicherweise führte Dexamethason zu einer Hemmung der Aktivität. Lane untersuchte ebenfalls die Chemilumineszenz unter relativ ähnlichen Bedingungen wie in

dieser Arbeit. Es handelte sich um aus Vollblut gewonnene Granulozyten, die in Konzentrationen von  $3,3 \times 10^7$  Zellen/ml gelagert wurden. Bei 6°C reduzierte sich die Intensität der Chemilumineszenz nach 24 Stunden auf 92% und nach 48 Stunden auf 55% des Ausgangswertes (95), was relativ genau den Ergebnissen der Lagerung bei 4°C in dieser Arbeit entspricht. Insgesamt lagen die Werte für die Chemilumineszenz nach 48 Stunden bei Lagerung in CPD Plasma und bei Raumtemperatur mit Werten von knapp 80% (Luminol) bis gut 90% (Lucigenin) in einem sehr guten Bereich. Nach 72 Stunden wurden nur bei Messung mit Lucigenin noch Werte um 80% des Ausgangswertes erreicht.

### **5.6 Bestimmung von Phagozytose und Oxyburst im Durchflusszytometer**

Die Bestimmung der Phagozytose und des Oxyburst mit Hilfe der Durchflusszytometrie und den erhältlichen Testkits, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde stellt eine etablierte Methode zur Ermittlung des Aktivitätsniveaus der Granulozyten in vitro dar (100). Zu den Vorteilen der Durchflusszytometrie zählen zum einen die Möglichkeit mehrere Funktionen zeitgleich untersuchen zu können, in diesem Fall die Phagozytose und den Oxyburst, aber auch die höhere Genauigkeit im Vergleich zur Untersuchung mit dem Fluoreszenzmikroskop (116, 117) und die Möglichkeit durch die Zugabe einer Quenchinglösung zwischen tatsächlich aufgenommenen und nur oberflächlich angelagerten e-coli Bakterien zu unterscheiden (117). Die Intensität des Oxyburst reduzierte sich in den ungepoolten frisch aufgereinigten Leukozytenkonzentraten im Vergleich zu den Buffy Coats um 2-13 Prozent. Die Intensität der Phagozytose nahm nach Aufreinigung in allen Ansätzen ab und zwar um 11-32 Prozent. Die Messungen der Buffy Coats und der frischen Leukozytenkonzentrate erfolgten zeitgleich. So dass der Verdacht besteht die Abnahmen könnten mit dem Verfahren der Aufreinigung und/oder den dabei verwendeten Substanzen zusammenhängen. Einige Studien legen nahe, dass mittelmolekulares HES 200 die Fähigkeit der Zellen zur Chemotaxis (118) und niedermolekulares HES die Fähigkeit zum Oxyburst (119) reduziert. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Steigerung der Intensität des Oxyburst nach Aufreinigung auf durchschnittliche Werte von 117% in den gepoolten Ansätzen. Ein Erklärungsansatz wäre, dass der Kontakt zu fremden Zellen zu einer stärkeren Aktivierung führt, jedoch stieg nicht der Anteil der unstimuliert aktiven Zellen. Auch die Phagozytose war von diesem Effekt nicht betroffen. Der Anteil der stimulierbaren Zellen lag auch nach 72 Stunden in allen Ansätzen, außer den bei 4°C in Citratplasma gelagerten bei über 90%. Der Anteil der

unstimuliert aktiven Zellen wies zu allen Zeiten ein ähnliches Muster wie in den Buffy Coats auf. Ansätze, die aus Buffy Coats mit durchschnittlich niedrigeren Anteilen unstimuliert aktiver Zellen gewonnen wurden, wiesen auch zu späteren Messzeitpunkten durchschnittlich niedrigere unstimulierte Aktivitätsniveaus auf als Ansätze die aus Buffy Coats mit einem durchschnittlich höheren Anteil unstimuliert aktiver Zellen gewonnen wurden. Das spricht dafür, dass dieser Parameter vom Ausgangsmaterial abhängt. Faktoren, die die Vorstimulierung beeinflussen, könnten vom Spender abhängen. Denkbar wären entzündliche Prozesse während der Abnahme, ein höherer Anteil von Lymphozyten oder ein konstitutionell bedingtes reagibleres Immunsystem. Insgesamt zeigte sich zu allen Zeitpunkten eine leicht höhere Tendenz zu unstimulierter Aktivität während der Lagerung bei 4°C, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Die mit Dexamethason versehenen Zellen wiesen jeweils etwas niedrigere Anteile unstimuliert aktiver Zellen als die Vergleichsgruppe ohne Dexamethason auf. Die Lagerung in höherer Glucosekonzentration ging sowohl bei 4°C als auch bei Raumtemperatur zu allen Zeiten mit leicht höheren Anteilen unstimuliert aktiver Zellen einher, auch diese Unterschiede waren jedoch zu keiner Zeit signifikant. Bei Zugabe von HEPES kam es bei Raumtemperatur nach 48 und 72 Stunden zu niedrigeren Anteilen unstimuliert aktiver Zellen, dieser Unterschied war jedoch erst nach 72 Stunden signifikant. Bereits nach 24 Stunden kam es in einigen Ansätzen zu erheblichen Einschränkungen in der Intensität des Oxyburst. Die bei 4°C und Raumtemperatur in Beuteln gelagerten Zellen mit und ohne HEPES wiesen nur noch zwischen 60 und 70% ihrer Ausgangsaktivität auf. Nach 48 und auch nach 72 Stunden zeigten alle Ansätze hochsignifikant schlechtere Ergebnisse als die höher konzentrierten Ansätze ( $2 \times 10^7$  Zellen/ml) mit und ohne Dexamethason. Diese lagen immernoch bei über 100 Prozent der Ausgangsaktivität. Verantwortlich für diese deutlich besseren Ergebnisse der beiden Ansätze könnte zum einen die vierfach höhere Konzentration sein, in der die Zellen gelagert wurden. Eventuell wirkt sich, wie eine zu hohe (87, 91, 92) auch eine zu niedrige Lagerungskonzentration negativ auf die Zellen aus. Faktoren könnten hier der Anstieg des pH-Wertes bei niedrigeren Konzentrationen darstellen oder die Spiegel bestimmter Botenstoffe, die den Stoffwechsel, Aktivierung und Apoptose der Zellen beeinflussen. Der zweite Unterschied zu den „schlechteren“ Ansätzen stellt die Tatsache dar, dass die beiden Ansätze nicht aus einem Buffy Coat sondern aus zwei gepoolten, von verschiedenen Spendern gewonnenen Buffy Coats hergestellt wurden. Es sollte also auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass das Poolen von Buffy Coats verschiedener Spender die Funktionalität der

Zellen beeinflussen könnte. Hierzu könnten in weiteren Untersuchungen Ansätze in gleicher Lagerungskonzentration, einmal von einem einzelnen und einmal von zwei oder mehreren Spendern verglichen werden. Hinsichtlich des Einflusses der Lagerungstemperatur auf den Oxyburst kamen vorangegangene Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während Hubel von einer besseren Funktionalität der Zellen bei Kühlung auf 10°C berichtete (94) beschrieb Lane nach 48 Stunden bessere und nach 72 Stunden etwas schlechtere Werte während der Lagerung bei Raumtemperatur (95). In dieser Arbeit zeigten sich nach 48 Stunden in allen Gruppen leichte, nicht signifikante Vorteile für die Lagerung bei 4°C. Diese Tendenz hatte sich nach 72 Stunden jedoch ins Gegenteil verkehrt. Hinsichtlich der Glucosekonzentration und der Zugabe von HEPES ergaben sich keine eindeutigen Tendenzen. Bei Blutgasanalysen wurde ab der 5. Versuchsreihe festgestellt, dass das verwendete Plasma oft subphysiologische Kaliumspiegel aufwies, weshalb ab der 6. Versuchsreihe der Kaliumspiegel auf physiologische Werte eingestellt wurde. Die Ansätze denen Kaliumchlorid hinzugefügt wurde zeigten nach 24 Stunden bessere Werte als die anderen Gruppen, dieser Effekt verlor sich jedoch bei den späteren Messungen. Die mit Dexamethason versehenen Zellen zeigten erneut, wie bei der Chemilumineszenz, nicht signifikante leicht niedrigere Intensitäten des Oxyburst als die Vergleichsgruppe zu allen Messzeitpunkten.

Der Anteil, der durch E. coli-Bakterien zur Phagozytose stimulierbaren Zellen lag in allen Ansätzen und Zeitpunkten deutlich über 80 Prozent. Nach 72 Stunden lagen nur die Ansätze bei 4°C mit und ohne HEPES und der in CPD-Plasma bei Raumtemperatur gelagerte Ansatz unter 90 Prozent. Der Anteil unstimuliert (ohne E. coli) phagozytischer Zellen war insgesamt deutlich niedriger als der Anteil unstimulierter Ausschüttung reaktiver Sauerstoffspezies. Eine Erklärung dafür wäre das die Phagozytose stärker von einem spezifischen Stimulus wie einem zu phagozytierenden Partikel abhängt. In diesem Zusammenhang wären niedrige unstimulierte Aktivitätsniveaus als positiv zu bewerten, da sie für geringere Anteile abgestorbener und damit zu phagozytischer Zellen sprechen. Den niedrigsten Anteil unstimuliert aktiver Zellen bei gleichzeitig den höchsten Werten für die stimulierte Phagozytose wiesen die hoch konzentrierten Zellen mit und ohne Dexamethason auf. Mochizuki berichtete von schlechteren Phagozytose-Ergebnissen bei Lagerung in CPD-Plasma im Vergleich zu Heparin/Natrium (82). In dieser Arbeit ließen sich sowohl in Hinblick auf die Glukosekonzentration, die Zugabe von HEPES oder die Lagerungstemperatur keine signifikanten Unterschiede und auch keine durchgängigen Trends beobachten. Nach 48 und 72 Stunden wiesen die Zellen bei Raumtemperatur

jeweils etwas niedrigere Anteile unstimuliert aktiver Zellen auf als bei der 4°C Lagerung. Die mit Dexamethason versetzten Zellen zeigten zu allen Zeitpunkten leicht niedrigere Werte als die Vergleichsgruppe, die Unterschiede wurden jedoch nicht signifikant. Dieser Unterschied könnte für ein durch Dexamethason insgesamt niedrigeres Aktivitätsniveau oder aber für einen geringeren Anteil apoptotischer Zellen sprechen. Hinsichtlich der Intensität der Phagozytose gab es zu allen Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ansätzen, jedoch zeigten die höher konzentrierten Zellen durchschnittlich immer die höchsten Werte. Nach 72 Stunden betrug die Intensität bei ihnen noch rund 80% vom Ausgangswert, bei den anderen Ansätzen bewegten sich die Werte zwischen 53 und 69 Prozent. Erneut ließen sich keine durchgängigen Muster im Hinblick auf die Glukosekonzentration, die Zugabe von HEPES oder die Temperatur erkennen. Leicht höhere Phagozytoseintensitäten zeigten zu allen Zeitpunkten die Dexamethason-Ansätze im Verhältnis zu den Vergleichsansätzen. Diese Tatsache spricht gegen eine grundsätzliche Reduzierung der Aktivität durch Dexamethason und eher für eine eventuelle verminderte Apoptotserate.

Insgesamt wiesen die gepoolten, bei Raumtemperatur, in CPD-Plasma gelagerten Ansätze mit einer Konzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml sowohl mit als auch ohne Dexamethason auch nach 72 Stunden noch eine gute bis sehr gute Funktionalität in Hinblick auf die stimulierte Phagozytose und den Oxyburst auf. Mehrere Autoren berichten von sehr hohen Funktionalitätsverlusten bereits nach 24 Stunden bei Lagerung hochkonzentrierter Granulozytenkonzentrate (Vorstimulierung der Spender durch G-CSF und/oder Dexamethason) und deutlichen Verbesserungen, bis zum guten Erhalt der Zellfunktionen über 48 und 72 Stunden bei Verdünnung in autologem Plasma oder Kulturmedien (87, 91, 92, 93). Mochizuki berichtet hingegen von stabilen Werten über 72 Stunden auch ohne Verdünnung (82).

Ein wichtiger Punkt, der in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht wurde scheint auch die Fähigkeit der Zellen zur Chemotaxis und zur Migration zu sein. Mehrere Autoren berichten, dass diese Fähigkeit der Zellen eher und stärker als alle anderen Funktionen abzunehmen scheint, bis hin zum teilweise fast völligen Verlust nach 48 Stunden (91, 95, 120, 121). Positiv auf die Fähigkeit zu Chemotaxis und Migration scheint sich laut einigen Studien die Lagerung bei Raumtemperatur im Vergleich zu 4°C und 37°C (95, 96, 106, 122), die Lagerung in autologem Plasma (123), eine höhere Glucosekonzentration (123), die Vorstimulierung der Spender mit G-CSF (91), ein stabiler pH-Wert (108) und eine Verdünnung der Granulozytenkonzentrate (123) auszuwirken. Kein positiver Effekt auf die

Fähigkeit zur Chemotaxis konnte hingegen für die spätere Zugabe von G-CSF zu den Konzentraten beobachtet werden (91, 94, 124). Von einer besseren Bewahrung der Chemotaxis bei auf 10°C reduzierter Lagerungstemperatur berichtete im Gegensatz zu mehreren anderen Autoren Hubel, der weiterhin feststellte, dass die Granulozyten nach 24-stündiger Lagerung auch in vivo ihre Fähigkeit zu zirkulieren und zu migrieren nicht verloren hatten (94).

### **5.7 Bestimmung von Glucose, Lactat und LDH**

Lactat entsteht beim anaeroben Abbau von Glucose über Pyruvat und gilt im weitesten Sinne als ein Parameter für das „Stresslevel“ der Zellen. Während einer Hypoxie kommt es zur vermehrten Lactatbildung, da das Gleichgewicht der LDH-Reaktion - aufgrund der intrazellulären Wasserstoffionenerhöhung - nach rechts und der NADH/NAD-Quotient zugunsten von NADH verschoben wird (125). Der Referenzwert im Serum liegt bei 0,6 - 2,4mmol/l. Die Lactatdehydrogenase (LDH) katalysiert wiederum die Oxidation von Lactat zu Pyruvat. Hier liegt der Referenzbereich bei Erwachsenen unter 240 Units/l. Die Lactatdehydrogenase wird als Marker für Zellschädigungen eingesetzt, da sie aus dem Zytoplasma zerstörter Zellen freigesetzt wird. Besonders viel Lactatdehydrogenase enthalten beispielsweise Erythrozyten und Thrombozyten (125, 126, 127). Es kam insgesamt zu einem geringen Verbrauch von Glucose. Weder bei Raumtemperatur noch bei den höher konzentrierten Zellen ließ sich ein durchgängiges Muster von höherem Verbrauch feststellen. Das spricht insgesamt für eine ausreichende Versorgung der Zellen in den untersuchten Lagerungskonzentrationen. Auch die Aktivität der Lactatdehydrogenase zeigte keine durchgängigen Tendenzen und blieb zu allen Zeitpunkten und bei allen Ansätzen im physiologischen Bereich, was dafür spricht, dass es nicht zu größeren Lysen von Zellen kam. Im Hinblick auf den Anstieg des Lactatspiegels ließ sich hingegen ein eindeutiges Muster erkennen. Der Anstieg fiel jeweils stärker aus bei Lagerung in höherer Temperatur, in CPD-Plasma und bei höherer Konzentration und lag außer bei den in Citratplasma gelagerten Ansätzen oberhalb des Referenzbereiches. Ursächlich für die höheren Spiegel in den genannten Ansätzen könnte zum einen die höhere Temperatur und der damit schnellere Stoffwechsel und zum anderen das höhere Glucose-Angebot im CPD-Plasma, das ggf. auch zu einem höheren Verbrauch führte sein. Eventuell führte die Lagerung in den höher konzentrierten Ansätzen oder bei höherer Temperatur auch zu einer Hypoxie der Zellen. Der Lactatspiegel bei der höher

konzentrierten Lagerung ohne Dexamethason stieg mit 7,6 mmol/l deutlich über den Referenzwert und fiel auch höher aus, als bei anderen Autoren, die Granulozyten in wesentlich höheren Konzentrationen lagerten (82). Die Ansätze mit höherem Lactatspiegel wiesen außerdem einen niedrigeren pH-Wert auf. Die Zugabe von Dexamethason hatte auf den Lactatspiegel positive Auswirkungen, sie führte zu einem geringeren Anstieg, dieser Unterschied wurde jedoch erst nach 72 Stunden signifikant.

## **5.8 Elektronenmikroskopie**

Auf den elektronenmikroskopischen Bildern der Leukozytenkonzentrate lassen sich netzartige Strukturen erkennen, die sich um und zwischen den Zellen befinden. Auf Abbildung 59 entsteht der Eindruck, als seien die Zellen in das großflächige Netz eingewebt. Hirsch stellte 1958 erstmalig die Theorie auf, dass Histone über die Bildung von Netzen in der Lage seien bestimmte Bakterien wie Escherichia, Salmonellen, Shigellen, Pseudomonaden und Klebsiellen zu töten (128). In der Literatur wird weiter über Netze berichtet, die sich aus Chromatin aus dem Zellkern von neutrophilen Granulozyten bilden und Proteine enthalten, die Erreger abtöten können (128, 129). Die Netze können die 10 - 15-fache Größe der Ursprungszelle erreichen und ihre Bildung geht mit der Apoptose der Zelle einher (130). Der Bildung der Netze geht die Auflösung der intrazellulären Membranen voraus (131) wodurch sich Cyto- und Nucleoplasma vermischen, schließlich kommt es zur Ruptur der Zellmembran (132). Die Elektronenmikroskopie stellt eine Methode zum Nachweis der Netze dar (129, 133, 134, 135). Wieso es in den untersuchten Ansätzen zu der Netzbildung kam und wie viele der Zellen davon betroffen waren, lässt sich mit den einzelnen Bildern nicht näher ermitteln. Als weitere außer den oben genannten Auslösern nennt Brinkmann (130) zahlreiche Erreger, darunter auch Pilze und Viren, aber auch reaktive Sauerstoffspezies (131), Antikörper (136) und aktivierte Thrombozyten (29). In Abbildung 62 lassen sich oben rechts im Bild stäbchenförmige Bakterien erkennen, die die Reaktion ausgelöst haben könnten. Jedoch kämen auch reaktive Sauerstoffspezies oder aktivierte Thrombozyten als Ursache in Frage. In Hinblick auf die hohe Vitalität, Zellzahl und Aktivität in den Ansätzen kann man jedoch davon ausgehen, dass nur ein geringer Anteil der Neutrophilen betroffen war.

## **6. Zusammenfassung**

In Deutschland werden nach Hochrechnungen jährlich etwa 150 000 Patienten wegen einer Sepsis behandelt, wobei ca. 60 000 an der Erkrankung versterben. Die Sepsis ist damit in Deutschland die dritthäufigste Todesursache nach dem Myokardinfarkt und der Herzinsuffizienz. Erste klinische Studien zeigen vielversprechende Ergebnisse für die Therapie septischer Patienten mit Hilfe des Extrakorporalen Immununterstützungssystems -EISS. Bei diesem Verfahren gelangt das Plasma des Patienten, ähnlich dem Prinzip der Apherese, in einen Bioreaktor mit Spendergranulozyten, die dort Aufgaben des überforderten Immunsystems des Patienten übernehmen sollen. Auch die Behandlung neutropener Patienten, beispielweise während einer Chemotherapie oder nach Knochenmarkstransplantation stellt ein Anwendungsgebiet für Granulozytenkonzentrate dar. Die Verfügbarkeit der Konzentrate ist durch die beschränkte Lagerungszeit der Zellen (derzeit empfohlenen maximal 24 Stunden) stark eingeschränkt.

Ziel dieser Arbeit sollte es sein, systematisch verschiedene Lagerungsbedingungen zu vergleichen und eine Methode zu finden, Granulozyten, die aus Buffy Coats gewonnen wurden bis zu 72 Stunden bei bestmöglichem Erhalt ihrer Vitalität und Funktionalität lagern zu können. Dazu wurden insgesamt 23 Buffy Coats nach einem arbeitsgruppeninternen Verfahren aufgereinigt und 20 verschiedene Lagerungsbedingungen verglichen. Untersucht wurden zwei verschiedene Lagerungsbehältnisse, drei Zellkonzentrationen, drei Temperaturen, zwei Plasmen, die sich in der Glukosekonzentration unterschieden und verschiedene Zusätze wie Citrat-Puffer, HEPES, Kaliumchlorid und Dexamethason. Für die letzte Versuchsreihe wurden die Granulozyten zudem durch das Mischen zweier Buffy Coats gewonnen und stammten somit von zwei verschiedenen Spendern.

Von allen Ansätzen wurde direkt nach der Aufreinigung und dann alle 24 Stunden über 72 Stunden ein Differentialblutbild, die Vitalität der Zellen durch den Trypanblau-Test sowie der induzierbare Oxyburst durch Chemilumineszenz mit Luminol und Lucigenin als Enhancer bestimmt. In späteren Versuchsreihen kamen an Methoden hinzu: die Bestimmung des pH-Wertes durch ein Blutgasanalysegerät, die durchflusszytometrische Bestimmung von Phagozytose und Oxyburst und der Spiegel von Glucose und Lactat, sowie der Aktivität der Lactatdehydrogenase. Während der letzten Versuchsreihe wurden

zudem während eines Durchganges elektronenmikroskopische Bilder der Ansätze hergestellt.

Durch das verwendete Aufreinigungsverfahren ließen sich durchschnittlich aus dem Buffy Coat eines nicht vorstimulierten Spenders  $0,95 \times 10^9$  weiße Blutzellen, davon  $0,61 \times 10^9$  neutrophile Granulozyten gewinnen. Die Anzahl an roten Blutzellen reduzierte sich um 99% und die an Thrombozyten um 95%. Der Verlust an weißen Blutzellen durch die Aufreinigung betrug ca. 50% wobei es sich überwiegend um Lymphozyten handelte.

Als erfolgreichste Lagerungsmethode im Hinblick auf die Vitalität und Funktionalität der Zellen erwies sich die Lagerung in sterilen Kunststoffbeuteln mit niedriger Gaspermeabilität, in CPD-Plasma, bei Raumtemperatur und in einer Konzentration von  $2 \times 10^7$  weißen Blutzellen/ml. Zum Plasma zugesetzt wurde ein Citrat-Puffer und Kaliumchlorid Lösung bis zu einem physiologischen Kaliumspiegel mit Werten zwischen 3,5 - 4,5 mmol/l. Außerdem zeigten sich bei der Beutellagerung im direkten Vergleich jeweils Vorteile für die Lagerung bei Raumtemperatur im Vergleich zu 4°C und vor allem zu 37°C. Bei der erfolgreichsten Lagerung wiesen die Zellen auch nach 72 Stunden in den durchgeführten Untersuchungen durchschnittlich eine hohe Vitalität und eine überwiegend hohe Funktionalität auf. Zellzahl und Vitalität bewegten sich bei 95 und 98 Prozent, die durchflusszytometrisch bestimmte Intensität von Oxyburst und Phagozytose lag bei 112 und 80% ausgehend von den Buffy Coats und die durch Zymosan induzierte Chemilumineszenz bei 78% bei Messung mit Lucigenin und bei 49% bei Messung mit Luminol ausgehend vom frischen Leukozytenkonzentrat. Der pH-Wert lag mit 7,2 in einem vertretbaren Bereich. Diese Ergebnisse sind vergleichbar und zum Teil besser als die anderer Autoren, die jedoch überwiegend Granulozytenkonzentrate vorstimulierter Spender untersuchten.

## **7. Ausblick und Bewertung**

Insgesamt handelt es sich um ein sehr vielversprechendes Zwischenergebnis. Anzumerken ist jedoch auch, dass 33 benötigte Buffy Coats für ein Leukozytenkonzentrat eine hohe Anzahl darstellen. Die Buffy Coats entstehen zwar im Rahmen einer Vollblutspende und stellen für den Spender keine zusätzliche Belastung dar, mit den zur Verfügung stehenden Blutspenden könnte jedoch nur ein begrenzter Bedarf gedeckt werden. Das in dieser Arbeit verwendete Aufreinigungsverfahren eignet sich zudem nicht für die Herstellung größerer Mengen an Leukozytenkonzentraten. Hier gibt es jedoch Arbeitsgruppen-interne Versuche zu einem Aufreinigungsverfahren in einem geschlossenen System aus Kunststoffbeutel. In unseren Versuchen gab es Probleme mit der genauen Unterscheidung der Leukozytenuntergruppen. Für die genauere Bestimmung könnten hier weniger fehleranfällige Verfahren wie die Immunphänotypisierung im Durchflusszytometer oder die Bestimmung mittels eines Coulter Counters angewendet werden. Auch die Vitalität der Zellen lässt sich mittels Durchflusszytometrie oder Nachweis von Annexin V weniger Untersucher-abhängig bestimmen. Bei der Bestimmung des Oyburst mittels Chemilumineszenz wurde hier erst das aufgereinigte Leukozytenkonzentrat, nicht jedoch der Buffy Coat untersucht, so dass Einflüsse des Aufreinigungsverfahrens nicht bestimmbar sind; dies sollte in weiteren Versuchen eventuell mit beachtet werden. Ein Nachteil der Chemilumineszenz stellt zudem die Induktion zur Radikalbildung durch Lucigenin dar, was zu verfälschten Ergebnissen führen könnte. Um sicherere Aussagen über die Funktionalität der Zellen machen zu können, wären weitere Untersuchungen mit größeren Stichproben, sowie auch die Bestimmung der Fähigkeit zur Chemotaxis zu empfehlen. Endgültige Sicherheit über die Qualität der Zellen kann letztendlich jedoch nur die Untersuchung in vivo geben.

## **8. Thesen**

1.) Die Sepsis zählt in Deutschland mit einer Letalität von gut 36% nach dem Myokardinfarkt und der der Herzinsuffizienz zur dritthäufigsten Todesursache. Es besteht ein Bedarf an weiteren Therapiemöglichkeiten.

2.) Die Behandlung septischer Patienten mit Hilfe eines Extrakorporalen Immununterstützungssystems „EISS“, bei dem das Plasma erkrankter Patienten durch einen Bioreaktor mit Spendergranulozyten geleitet wird, hat sich in ersten klinischen Studien als erfolgversprechend erwiesen.

3.) Neben „EISS“ bestehen noch weitere Einsatzgebiete für Granulozyten, beispielsweise als Diagnostikum in der Forschung oder als Therapeutikum im Rahmen der leukopenen Sepsis. Um Therapien mit Granulozyten durchführen zu können, ist eine bessere Verfügbarkeit von Leukozytenkonzentraten notwendig. Dies kann durch Vereinfachung der Herstellung und Verlängerung der möglichen Lagerungsdauer der Konzentrate erreicht werden.

4.) Das bisher zur Gewinnung von Granulozyten durchgeführte Prinzip der Apherese mit vorheriger Stimulation mit G-CSF und/oder Steroiden stellt im Vergleich zur normalen Blutspende eine Belastung für den Spender dar und ist nur im Rahmen von Studien und mit Probandenversicherungen möglich.

5.) Granulozytenreiche Buffy Coats entstehen im Rahmen einer normalen Blutspende. Aus dem Buffy Coat eines nicht vorstimulierten Spenders lassen sich mit dem verwendeten Aufreinigungsverfahren durchschnittlich  $0,95 \times 10^9$  weiße Blutzellen, davon  $0,61 \times 10^9$  neutrophile Granulozyten gewinnen. Damit würden 33 Buffy Coats benötigt, um eine ausreichende Menge Granulozyten für eine einmalige Behandlung zu erhalten.

6.) Die Anzahl an Erythrozyten und Thrombozyten reduziert sich in der angewendeten Aufreinigungsmethode um 99% und 95%, womit das verwendete Verfahren in diesem Aspekt der Apherese überlegen ist. Der Verlust an weißen Blutzellen durch die Aufreinigung beträgt ca. 50%, wobei es sich überwiegend um Lymphozyten handelt.

7.) Die aus Buffy Coats gewonnenen Zellen weisen nach 48 und 72 Stunden vergleichbare oder bessere Ergebnisse hinsichtlich Vitalität und Funktionalität auf als Granulozyten anderer Autoren die durch Stimulierung mit G-CSF und/oder Dexamethason gewonnen wurden.

8.) Bezüglich der Bestimmung der Intensität der Chemilumineszenz, als Nachweis für den Oxyburst zeigen sich große Unterschiede zwischen den Messungen mit Luminol und Lucigenin sowie zur Durchflusszytometrie.

9.) Die Lagerung in sterilen Kunststoffbeuteln mit niedriger Gaspermeabilität im Vergleich zu Zellkulturflaschen mit luftdurchlässigen Filterkappen führt zu einer Verbesserung der Vitalität und Funktionsfähigkeit der Granulozyten.

10.) Als vorteilhaft für die Bewahrung der Funktionalität der Zellen erweist sich weiterhin die Lagerung bei Raumtemperatur im Vergleich zu 4°C und 37°C sowie in Glucose-reichem CPD-Plasma.

11.) Das Mischen zweier Buffy Coats verschiedener Spender zeigt keine negativen Auswirkungen auf die Vitalität und Funktionalität der Zellen. Das Poolen und die Vervierfachung der Lagerungskonzentration auf  $2 \times 10^7$  Leukozyten pro Milliliter ist den niedriger konzentrierten nicht gepoolten Zellen hinsichtlich der bestimmten Parameter in allen Bereichen überlegen.

12.) Der pH-Wert hält sich bei der hier verwendeten Lagerungsmethode in einer Konzentration von  $2 \times 10^7$  Leukozyten pro Milliliter leicht unter dem physiologischen Bereich.

**13.)** Die Zugabe von Dexamethason in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-5}$  mol/l zu Leukozytenkonzentraten führt nicht zu signifikanten Unterschieden in Vitalität und Funktionalität der Zellen, jedoch zu signifikant niedrigeren Anstiegen der Laktatkonzentration.

**14.)** Leukozytenkonzentrate können über 72 Stunden bei in vitro Erhalt der Vitalität und der Fähigkeit zu Phagozytose und Oxyburst gelagert werden.

**15.)** Hiermit tragen die Versuche dieser Arbeit dazu bei ein Produkt mit diagnostischer und therapeutischer Bedeutung für die Zukunft zu entwickeln.

## 9. Literaturverzeichnis

[1] Junqueira L.C.U, Carneiro J. Histologie, 6. Auflage, Springer 2004; S. 193 -202.

[2] Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multiple paradigm. Cell 1994, 7; 301-314.

[3] Smalley D.M, Ley K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. J Cell Mol Med 2005; 9: 255-266.

[4] Walzog B, Gaehtgens P. Adhesion Molecules: The path to a new understanding of acute inflammation. News Physiol Sci 2000, 15; 107-113.

[5] <http://edoc.hu-berlin.de/habilitationen/hippenstiel-stefan-2003-10-23/HTML/chapter2.html>, 03.04.2014; S36.

[6] Smith J.A. Neutrophils, host defense and Inflammation: a double-edged sword. J Leuk Biol 1994, 56; 672-686.

[7] Rink L, Kruse A, Haase H. Immunologie für Einsteiger. Springer 2012.

[8] Della Bianca et al. Studies on molecular regulation of phagocytosis and activation of the NADPH oxidase in neutrophils. IgG- and C3b-mediated ingestion and associated respiratory burst independent of phospholipid turnover and Ca<sup>2+</sup> transients. J Immunol 1990 Feb 15; 144(4):1411-7.

[9] Engel et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. N Engl J Med 2007, 33; 606–618.

[10] Brunkhorst F.M. Epidemiologie, Ökonomie und Praxis - Ergebnisse der deutschen Prävalenzstudie des Kompetenznetzwerkes Sepsis (SepNet). Thieme 2006, 41(1); 43-44.

[11] <http://www.sepsis-hilfe.org/de/informationen-zur-sepsis/haeufigkeit.html>, 17.01.2014.

[12] Schottmüller H. Verhandlungen des 31. Deutschen Kongresses für Innere Medizin. Band 31, 1914; S. 257-280.

[13] AWMF online - S2-Leitlinie/Methodenreport - Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis, Leitlinienreport, 2010, [www.awmf.org](http://www.awmf.org), 17.01.2014.

[14] Bone et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest 06/1992; S. 1644–1655.

[15] Singer et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA 02/2016; 315(8):801-810

[16] Oberholzer et al. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. Shock 2001 Aug, 16(2); 83-96.

[17] Vincent J.L, Abraham E. The last 100 years of sepsis. Am J Respir Crit Care Med 2006 Feb 1; 173(3):256-63.

[18] Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature 2002 Dec 19-26; 420 (6917): 885-91.

[19] Hotchkiss R.S, Karl I.E. The pathophysiology and treatment of sepsis. N Engl J Med 2003 Jan 9; 348(2):138-50. Review, PMID: 12519925.

[20] Löffler, Petrides. Biochemie – Pathobiochemie, 7. Auflage. Springer 2003.

[21] Okajima K. Regulation of inflammatory responses by natural anticoagulants. Immunol Rev 2002, 184; 258-274.

[22] Goldenberg et al. Broken barriers: a new take on sepsis pathogenesis. Sci Transl Med 2011, 3; 88ps25.

- [23] Brown et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* 2006 Jul 8, 368(9530);157-69. Review.
- [24] Landry D.W, Oliver J.A. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N. Engl. J. Med* 2001, 345; 588-595.
- [25] Sawyer D.B. Loscalzo J. Myocardial hibernation: restorative or preterminal sleep? *Circulation* 2002, 105; 1517-9.
- [26] Aldridge A.J. Role of the neutrophil in septic shock and the adult respiratory distress syndrome. *Eur J Surg* 2002, 168(4); 204-14. Review.
- [27] Lögters et al. The clinical value of neutrophil extracellular traps. *Med Microbiol Immunol* 2009 Nov, 198(4); 211-9.
- [28] Medina E. Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host. *J Innate Immun* 2009, 1; 176–180.
- [29] Clark et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007, 13; 463–469.
- [30] Nelson et al. A randomized controlled trial of filgrastim as an adjunct to antibiotics for treatment of hospitalized patients with community acquired pneumonia. *J Infect Dis* 1998, 178; 1075-80.
- [31] Root et al. A multicenter, double-blind, placebo-controlled study of the use of filgrastim in patients hospitalized with pneumonia and severe sepsis. *Crit Care Med* 2003 Feb 31(2); 367-73.
- [32] Shubin et al. Anti-inflammatory mechanisms of sepsis. *Contrib Microbiol* 2011, 17; 108-24.
- [33] Ward et al. The compensatory anti- inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clin Chest Med* 2008, 29; 617– 625.

[34] Andersson U, Tracey K.J. Reflex principles of immunological homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2012, 30; 31.3-35.

[35] Angus D, van der Poll T. Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med* 2013, 369; 840-851.

[36] Laupland et al. Polyclonal intravenous immunoglobulin for the treatment of severe sepsis and septic shock in critically ill adults: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med* 2007, 35; 2686-92.

[37] Bernard et al. Efficacy and safety of recombinant humanactivated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001, 344; 699-709.

[38] Ranieri et al. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med* 2012, 366; 2055-64.

[39] Joost W.C. Current insights in sepsis: from pathogenesis to new treatment targets. *Curr Opin Crit Care* 2011 Oct, 17 (5); 480-6.

[40] Griesdale et al. Intensive insulin therapy and mortality among critically ill patients: a meta-analysis including NICE-SUGAR study data. *CMAJ* 2009, 180; 821–827.

[41] Dellinger et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock 2012. *Crit Care Med* 2013, 41; 580-637.

[42] Transfusionsgesetz der Bundesärztekammer im Einvernehmen mit dem Paul-Ehrlich Institut, aufgestellt gemäß §§ 12a u. 18, Richtlinien zur Gewinnung von Blut- und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). Zweite Richtlinienanpassung 2010.

[43] Gesetz zur Regelung des Transfusionswesens vom 7.7.1998, zuletzt geändert 10.02.2005, in *Bundesgesetzblatt*. 2005, S. 234.

- [44] Zimmermann et al. A survey of blood component use in a German university hospital. *Transfusion* 1997, 37(10); 1075-83.
- [45] Gastineau D.A, Hoagland HC. Hematologic effects of chemotherapy. *Semin Oncol* 1992, 19(5); 543-50.
- [46] Strauss R.G. Role of granulocyte/neutrophil transfusions for haematology/oncology patients in the modern era. *British Journal of Haematology* 2012, 158; 299-306.
- [47] Wright et al. Lethal pulmonary reactions associated with the combined use of amphotericin B and leukocyte transfusions. *N Engl J Med* 1981, 304(20); 1185-9.
- [48] Stanworth et al. Granulocyte transfusions for treating infections in patients with neutropenia or neutrophil dysfunction. *Cochrane Database Syst Rev* 2005(3); CD005339.
- [49] Peters et al. Leucocyte transfusions from rhG-CSF or prednisolone stimulated donors for treatment of severe infections in immunocompromised neutropenic patients. *Br J Haematol* 1999, 106(3); 689-96.
- [50] Graw et al. Normal granulocyte transfusion therapy: treatment of septicemia due to gramnegative bacteria. *The New England Journal of Medicine* 1972, 287; 367–371.
- [51] Higby et al. Filtration leukapheresis for granulocyte transfusion therapy. Clinical and laboratory studies. *The New England Journal of Medicine* 1975, 292; 761–766.
- [52] Fortuny et al. Granulocyte transfusion: a controlled study in patients with acute non-lymphocytic leukemia. *Transfusion*, 1975, 15; 548.
- [53] Herzig et al. Successful granulocyte transfusion therapy for gram-negative septicemia. A prospectively randomized controlled study. *The New England Journal of Medicine* 1977, 296; 701-705.

[54] Vogler W.R, Winston E.F. A controlled study of the efficacy of granulocyte transfusions in patients with neutropenia. *The American Journal of Medicine* 1977, 63; 548–555.

[55] Winston et al. Therapeutic granulocyte transfusions for documented infections. A controlled trial in ninety-five infectious granulocytopenic episodes. *Annals of Internal Medicine* 1982, 97; 509–515.

[56] Alavi et al. A randomized clinical trial of granulocyte transfusions for infection in acute leukemia. *The New England Journal of Medicine* 1977, 296; 706–711.

[57] Grigg et al. G-CSF stimulated donor granulocyte collections for prophylaxis and therapy of neutropenic sepsis. *Australian and New Zealand Journal of Medicine* 1996. 26; 813–818.

[58] Price et al. Phase I/II trial of neutrophil transfusions from donors stimulated with G-CSF and dexamethasone for treatment of patients with infections in hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2000, 95; 3302–3309.

[59] Hubel et al. Granulocyte transfusion therapy for infections in candidates and recipients of HPC transplantation: a comparative analysis of feasibility and outcome for community donors versus related donors. *Transfusion* 2002, 42; 1414–1421.

[60] Strauss R.G. Granulocyte (neutrophil) transfusion therapy. *Transfusion Therapy: Clinical Principles and Practice* (ed. by B.D. Mintz), AABB Press, Bethesda, MD 2011; 133–448.

[61] Adkins et al. Effect of leukocyte compatibility on neutrophil increment after transfusion of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized prophylactic granulocyte transfusions and on clinical outcomes after stem cell transplantation. *Blood* 2000, 95; 3605-3612.

[62] Adkins et al. Reduction in antibiotic utilization and in febrile days by transfusion of G-CSF mobilized prophylactic granulocyte components: a randomized study. *Blood* 1999, 94; 590a.

[63] Adkins et al. Transfusions of granulocyte-colony-stimulating factor-mobilized granulocyte components to allogeneic transplant recipients: analysis of kinetics and factors determining posttransfusion neutrophil and platelet counts. *Transfusion* 1997, 37; 737-748.

[64] Blum et al. Improved survival in allogeneic peripheral blood stem cell (PBSC) transplant patients who received prophylactic granulocyte transfusions from HLA-matched donors: long-term follow-up. *Blood* 2001, 98; 58a.

[65] Klein et al. Granulocyte transfusion therapy. *Semin Hematol* 1997, 33; 359-368.

[66] Buckner C.D and Clift R. Prophylaxis and treatment of infection of the immunocompromised host by granulocyte transfusions. *Clin Haematol* 1987, 13; 557-572.

[67] Bensinger et al. The effects of daily recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration on normal granulocyte donors undergoing leukapheresis. *Blood* 1993, 81; 1883-1888.

[68] Hester et al. Collection and transfusion of granulocyte concentrates from donors primed with granulocyte stimulating factor and response of myelosuppressed patients with established infection. *J Clin Apheresis* 1995, 10; 188-193.

[69] Liles et al. A comparative trial of granulocyte-colony-stimulating factor and dexamethasone, separately and in combination, for the mobilization of neutrophils in the peripheral blood of normal volunteers. *Transfusion* 1997, 37; 182-187.

[70] Cairo et al. Randomized trial of granulocyte transfusions versus intravenous immune globulin therapy for neonatal neutropenia and sepsis. *J Pediatr* 1992, 120; 281-285.

[71] Strauss R.G. Current status of granulocyte transfusions to treat neonatal sepsis. *J Clin Apheresis* 1989, 5; 25-29.

[72] Bielorai et al. Successful treatment of invasive aspergillosis in chronic granulomatous disease by granulocyte transfusions followed by peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2000, 26; 1025–1028.

[73] Yomtovian et al. Granulocyte transfusion therapy in chronic granulomatous disease. Report of a patient and review of the literature. *Transfusion* 1981, 21;739–743.

[74] Apheresestandard der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Klinische Nephrologie e.V [http://www.dgfn.eu/fileadmin/download/Apharesestandard\\_2003.pdf](http://www.dgfn.eu/fileadmin/download/Apharesestandard_2003.pdf), 03.04. 2014.

[75] Rossi et al. *Principles of Transfusion Medicine*. 2. Edition 1996, Baltimore: Williams & Wilkins.

[76] Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie. Durchführung präparativer zellulärer Hämapheresen zur Gewinnung von Blutbestandteilkonzentraten. II. Empfehlungen zur präparativen Leuko- und Thrombozytapherese der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI). *Infusionsther Transfusionsmed* 1998, 25; 376-382.

[77] Bundesärztekammer. Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaprodukten, 3. überarbeitete und erweiterte Auflage. Deutscher Ärzte-Verlag 2003, Köln; 49-61.

[78] Altrichter et al. Extracorporeal cell therapy of septic shock patients with donor granulocytes: a pilot study. *Crit Care* 2011, 15(2); R82.

[79] Sauer et al. Extracorporeal cell therapy with granulocytes in a pig model of Gram-positive sepsis. *Crit Care Med* 2009 Feb; 37(2); 606-13.

[80] Vladimirov and Sherstnev. *Advances in Science and Technology*. Ser. Biophysics [in Russian] 1989; Vol. 24.

- [81] Vladimirov YA, Proskurnina EV. Free radicals and cell chemiluminescence. *Biochemistry (Mosc)* 2009 Dec, 74(13); 1545-66.
- [82] Mochizuki et al. Extended storage of granulocyte concentrates mobilized by G-CSF with/without dexamethasone and collected by bag separation method. *Transfusion Medicine* 2007, 17; 296–303.
- [83] Akaihata et al. Maintenance of surface antigens and the absence of an apoptotic marker are observed during storage of granulocyte concentrates collected by bag separation method. *Transfus Apher Sci* 2012 Aug, 47(1); 43-47.
- [84] Kunkel et al. Interleukin-8 (IL-8) the major neutrophil chemotactic factor in the lung. *Experimental Lung Research* 1991, 17; 17–23.
- [85] Rot A. Some aspects of NAP-1 pathophysiology: lung damage caused by a blood-borne cytokine. *Advance Experimental Medical Biology* 1991, 305; 127–135.
- [86] Heddle et al. The role of the plasma from platelet concentrates in transfusion reactions. *The New England Journal of Medicine* 1994, 381; 625–628.
- [87] Schwanke et al. Storage of neutrophil granulocytes (PMNs) in additive solution or in autologous plasma for 72 h. *Transfusion Medicine* 2005, 15; 223–231.
- [88] Bux et al. Tolerance of granulocyte donors towards granulocyte colony-stimulating factor stimulation and of patients towards granulocyte transfusions: results of a multicentre study. *Vox Sang* 2003, 85; 322–325.
- [89] Stroncek et al. Alloimmunization after granulocyte transfusions. *Transfusion* 1996, 36; 1009–1015.
- [90] Voak et al. Guidelines on gamma irradiation of blood components for the prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease. *Transfusion Medicine* 1996, 6; 261–271.

- [91] Bashir et al. Neutrophil function is preserved in a pooled granulocyte component prepared from whole blood donations. *Br J Haematol* 2008 Mar, 140(6); 701-11.
- [92] Lightfoot et al. Storage of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized granulocyte concentrates. *Transfusion* 2000, 40; 1104–1110.
- [93] Lightfoot et al. Evaluation of solutions for the storage of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized granulocyte concentrates. *Vox Sang* 2001 Feb, 80(2); 106-11.
- [94] Hubel et al. Effective storage of granulocytes collected by centrifugation leukapheresis from donors stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor. *Transfusion* Volume 45, December 2005.
- [95] Lane TA and Windle B. Granulocyte concentrate function during preservation: effect of temperature. *blood* 1979, 54; 216-225.
- [96] McCullough et al. Effects of temperature on granulocyte preservation. *Blood* 1978, 52; 301-10.
- [97] Lane TA, Lamkin GE. Adherence of fresh and stored granulocytes to endothelial cells. Effect of storage temperature. *Transfusion* 1988, 28; 237-242.
- [98] Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology* 2001, 21; A.3B.1–A.3B.2.
- [99] Shapiro H.M. *Practical Flow Cytometry*. John Wiley & Sons, New York 1988; 129.
- [100] Bashir S. and Cardigan R. Granulocyte concentrates: how can we assess their quality?. *Transfusion Medicine* 2003, 13; 245–258.
- [101] Ormerod M.G. Further applications to cell biology. *Flow Cytometry. A Practical Approach*, IRL Press, Oxford 1996; 261–273.

[102] Shapiro HM. Practical Flow Cytometry. Wiley-Liss Inc, New York, USA 1995, 3rd edn.

[103] Koopman et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B-cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994, 84; 1415–20.

[104] Homburg et al. Human neutrophils lose their surface FccRIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 1995, 85; 532–40.

[105] Liles et al. Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils. *blood* 1995, 86; 3181-3188.

[106] McCullough et al. Effects of storage of granulocytes on their fate in vivo. *Transfusion* 1983, 23; 20–24.

[107] Glasser et al. Granulocyte concentrates: glucose concentrations and glucose utilization during storage at 22°C. *Transfusion* 1985, 25; 68–69.

[108] Lane TA. and Lamkin GE. Hydrogen ion maintenance improves the chemotaxis of stored granulocytes. *Transfusion* 1984, 24; 231-237.

[109] Eriksson et al. Storage of Buffy Coat Preparations at 22°C in Plastic Containers with Different Gas Permeability. *Vox Sang* 1997, 73; 74–80.

[110] Liles et al. Cross-linking of CD45 enhances activation of the respiratory burst in response to specific stimuli in human phagocytes. *J Immunol* 1995, 155; 2175-2184.

[111] Liles et al. Cross-linking of CD18 primes human neutrophils for activation of the respiratory burst in response to specific stimuli: implications for adhesion-dependent physiological responses in neutrophils. *J Leukoc Biol* 1995, 58; 690-697.

[112] Allen R.C. Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: a kinetic approach to analysis. *Methods Enzymol* 1986, 133; 449-493.

- [113] Rembish S.J. and Trush M.A. Further evidence that lucigenin-derived chemiluminescence monitors mitochondrial superoxide generation in rat alveolar macrophages. *Free Radic Biol Med* 1994, 17(2); 117-126.
- [114] Liochev S.I. and Fridovich I. Lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. *Arch. Biochem Biophys* 1997, 337(1); 115-120.
- [115] Vasquez-Vivar et al. Superoxide anion formation from lucigenin: an electron spin resonance spin-trapping study. *FEBS Letters* 1997, 403; 127-130.
- [116] Bassoe C.F. Processing of staphylococcus aureus and zymosan particles by human leukocytes measured by flow cytometry. *Cytometry* 1984, 5; 86-91.
- [117] Bassoe C.F. & Bjerknes R. Phagocytosis by human leukocytes, phagosomal pH and degradation of seven species of bacteria measured by flow cytometry. *Journal of Medical Microbiology* 1985, 19; 115-125.
- [118] Hofbauer et al. Hydroxyethyl starch reduces the chemotaxis of white cells through endothelial cell monolayers. *Transfusion* 1999, 39; 289-294.
- [119] Jaeger et al. Effects of colloidal resuscitation fluids on the neutrophil respiratory burst. *Transfusion* 2001, 41; 1064-1068.
- [120] Humbert et al. Early damage to granulocytes during storage. *Seminars in Hematology* 1991, 28(3 Suppl 5); 10-13.
- [121] Wikman et al. Altered expression of adhesion molecules (l-selectin and Mac-1) on granulocytes during storage. *Transfusion* 1994, 34; 167-171.
- [122] Price T.H. & Dale D.C. Neutrophil preservation: the effect of short-term storage on in vivo kinetics. *The Journal of Clinical Investigation* 1977, 59; 475-480.
- [123] Glasser et al. Liquid preservation of human neutrophils stored in synthetic media at 22°C: controlled observations on storage variables. *Blood* 1985, 66; 267-272.

- [124] Leavey et al. Functional characteristics of neutrophils collected and stored after administration of G-CSF. *Transfusion* 2000, 40; 414-419.
- [125] Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie. Parameter und Referenzwerte. Charité Universitätsmedizin Berlin, 2013. [http://ilp.charite.de/service/parameter\\_und\\_referenzwerte/](http://ilp.charite.de/service/parameter_und_referenzwerte/) 11/2014.
- [126] Thomas L. Lactat. Labor und Diagnose, TH-Books 6. Aufl 2005; S. 298 ff L.
- [127] Iruhn H, Fölsch U. Labor Medizin: Indikationen, Methodik und Laborwerte, Pathophysiologie und Klinik. Schattauer, 2. Auflage 2008; S. 354, S. 9.
- [128] Hirsch J.G. Bactericidal action of histone. *J. Exp. Med* 1958, 108; 925–944.
- [129] Brinkmann et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004, 303; 1532–1535.
- [130] Brinkmann and Zychlinsky Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *J. Cell Biol* 2012, Vol. 198 No. 5; 773–783.
- [131] Steinberg and Grinstein. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci STKE* 2007; 11.
- [132] Fuchs et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol* 2007, 176; 231-241.
- [133] Hakkim et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, 107; 9813–9818.
- [134] Metzler et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood* 2011, 117; 953–959.

[135] Remijsen et al. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ* 2011, 18; 581–588.

[136] Kessenbrock et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 2009, 15; 623–625.

## **10. Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Tübingen, Juni 2016

Susanne Reichert

## **11. Danksagung**

Herzlich bedanken möchte ich mich bei all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. Steffen Mitzner danke ich für die Überlassung des Themas und die hervorragende Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med. Jens Altrichter und dem gesamten Team des Artcline und CEOS Labors für die Hilfe bei der Versuchsplanung, die gute Einarbeitung im Labor und die konstante Betreuung bei jeglichen Fragen und Problemen.

Prof. Dr.-Ing. Günther Kundt danke ich für die Beratung und Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Herzlich bedanken möchte ich mich zuletzt auch bei meiner Familie für die konstante Unterstützung während des Studiums, ohne welche diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, sowie bei meinem Mann Steffen Reichert.