

Aus dem Zentrum für Innere Medizin – Abteilung für Infektiologie, Tropenmedizin und
Nephrologie, Sektion Nephrologie
Universitätsmedizin Rostock
Sektionsleiter: Prof. Dr. med. Steffen Mitzner



**Rückgewinnung und Bewertung von Leukozyten aus
Depletionsfiltern zur möglichen Anwendung in Therapie und
Forschung**

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

Vorgelegt von
Annekathrin Mießner
Geboren am 17.12.1995 in Stralsund

Berlin, Februar 2023

Gutachter:

Prof. Dr. med. Steffen Mitzner, Universitätsmedizin Rostock, Sektion Nephrologie

Prof. Dr. med. Thomas Thiele, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Transfusionsmedizin

Univ.-Prof. Dr. med. Peter R. Mertens, Universitätsklinikum Magdeburg A. ö. R.,
Universitätsklinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten, Diabetologie und Endokrinologie

Jahr der Einreichung: 2023

Jahr der Verteidigung: 2024

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Das menschliche Immunsystem	1
1.1.1 Funktion und Aufbau des Immunsystems.....	1
1.1.2 Zelluläre Bestandteile des Immunsystems	2
1.1.3 Phagozytose und oxidativer Burst als zelluläre Abwehrmechanismen.....	3
1.2 Prinzipien der Leukozytenreduktion von Blutprodukten	4
1.2.1 Notwendigkeit der Leukozytenreduktion.....	4
1.2.2 Technische Möglichkeiten zur Leukozytenreduktion	5
1.2.3 Filtration.....	6
1.3 Verwendung von Leukozyten in Therapie und Forschung	8
1.3.1 Depletionsfilter als potenzielle Leukozyten-Quelle	8
1.3.2 Anwendung von Leukozyten im extrakorporalen Immunsupportsystem ARTICE®	9
2 Zielsetzung	13
3 Materialien und Methoden	15
3.1 Humane Blutprodukte	15
3.1.1 Buffy Coat.....	15
3.1.2 Verwendete Leukozytendepletionsfilter	15
3.2 Entwicklung der Methodik zur Rückgewinnung von Leukozyten.....	17
3.2.1 Filtrationsablauf.....	17
3.2.2 Bestimmung der Filtrationsdauer und der Filtrationsausbeute	17
3.2.3 Spülung in und entgegen der Flussrichtung	18
3.2.4 Dissoziation mit Trypsin.....	19
3.2.5 Dissoziation mit Accutase.....	20
3.2.6 Thrombozytenreduktion des Buffy Coats	20
3.3 Standarduntersuchungsmethoden zur Beurteilung der Leukozyten-Qualität.....	21
3.3.1 Zellzahlbestimmung mit dem Sysmex KX-21N	21
3.3.2 Vitalitätsbestimmung mit dem NucleoCounter® NC-200™.....	21
3.3.3 Mikroskopische Differenzierung und Bewertung	22
3.3.4 Messung der Phagozytose und des oxidativen Bursts mittels Durchflusszytometrie.....	23
3.4 Statistische Methoden	27

4	Ergebnisse	29
4.1	Charakterisierung eines typischen Buffy Coats	29
4.2	Leukozytenrückgewinnung nach Filtration – DONOpack von Lmb Technologie ..	32
4.2.1	<i>Filtrationsdauer, Filtrationsausbeute und Spülung in beide Flussrichtungen</i>	32
4.2.2	<i>Dissoziation mit Trypsin.....</i>	34
4.2.3	<i>Dissoziation mit Accutase.....</i>	38
4.2.4	<i>Ausbeute nach Thrombozytenreduktion des Buffy Coats.....</i>	42
4.3	Leukozytenrückgewinnung nach Filtration – Imugard® III RC von Terumo BCT .	43
4.3.1	<i>Filtrationsdauer, Filtrationsausbeute und Spülung in beide Flussrichtungen</i>	43
4.3.2	<i>Dissoziation mit Trypsin.....</i>	46
4.3.3	<i>Dissoziation mit Accutase.....</i>	50
4.3.4	<i>Ausbeute nach Thrombozytenreduktion des Buffy Coats.....</i>	53
4.4	Vergleich der untersuchten Filter	55
4.4.1	<i>Einfache Rückspülung</i>	55
4.4.2	<i>Dissoziation mit Trypsin.....</i>	56
4.4.3	<i>Dissoziation mit Accutase.....</i>	58
4.4.4	<i>Thrombozytenreduktion des Buffy Coats</i>	59
4.5	Reaktion eines Buffy Coats auf Trypsin und Accutase.....	60
4.5.1	<i>Reaktion auf Trypsin.....</i>	60
4.5.2	<i>Reaktion auf Accutase</i>	62
5	Diskussion	65
5.1	Beurteilung der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur	65
5.2	Beurteilung der Methodik im Vergleich zur Literatur	74
5.3	Schlussfolgerung und Ausblick.....	81
6	Zusammenfassung.....	83
7	Thesen.....	85
8	Literaturverzeichnis.....	87
9	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	99
9.1	Abbildungsverzeichnis	99
9.2	Tabellenverzeichnis.....	101

10	Danksagung	105
11	Curriculum Vitae	107
12	Eidesstattliche Versicherung	108
13	Anhang	110
13.1	Verwendete Geräte	110
13.2	Verwendete Materialien	111
13.3	Verwendete Chemikalien und Reagenzien	112

Abkürzungsverzeichnis

AO	<i>Acridinorange</i>
APACHE	<i>Acute Physiology And Chronic Health Evaluation</i>
CRP	<i>C-reaktives Protein</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidin-2-phenylindol</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
FFP	<i>Fresh Frozen Plasma</i>
FITC	<i>Fluoresceinisothiocynat</i>
G-CSF	<i>Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor</i>
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution, Hanks Salzlösung</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
MCH	<i>Mean corpuscular haemoglobin</i>
MCHC	<i>Mean corpuscular haemoglobin concentration</i>
MCV	<i>Mean corpuscular volume</i>
NET	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline, Phosphatgepufferte Salzlösung</i>
PCT	<i>Procalcitonin</i>
PI	<i>Propidiumiodid</i>
SAPS	<i>Simplified Acute Physiology Score</i>
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
U/min	<i>Umdrehungen pro Minute</i>
ZNS	<i>Zentrales Nervensystem</i>

1 Einleitung

1.1 Das menschliche Immunsystem

1.1.1 Funktion und Aufbau des Immunsystems

Das menschliche Immunsystem ist ein komplexes System, das aus vielen Komponenten besteht und zahlreiche Funktionen erfüllt. Ziel dieser Funktionen ist, die Integrität eines Organismus zu wahren (1). Um diese Aufgabe zu erfüllen, ist das Immunsystem unter anderem an folgenden Prozessen beteiligt (1,2):

- Abwehr von Erregern wie Bakterien, Viren und Pilzen
- Erkennung und Entfernung apoptotischer oder dysplastischer Zellen
- Beseitigung körperfremder Stoffe, zum Beispiel Chemikalien oder körperfremde Proteine
- Reparatur von Zell- und Gewebeschäden

Um diese Funktionen zu erfüllen, muss das Immunsystem zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen differenzieren können (1,3,4). Daher besteht eine Immuntoleranz gegenüber bestimmten Bestandteilen des menschlichen Körpers, zum Beispiel dem Mikrobiom (1).

Das Immunsystem des Menschen besteht aus zwei Systemen, die mit dem gemeinsamen Ziel zusammenarbeiten, den Körper vor Krankheitserregern zu schützen: dem angeborenen, unspezifischen und dem erworbenen (adaptiven) System.

Die adaptive Abwehr muss erst aktiviert werden. Aus diesem Grund läuft die Reaktion des angeborenen Systems schneller ab (5). Weiterhin wird zwischen der zellulären sowie der humoralen Immunabwehr differenziert. Lymphozyten, insbesondere B- und T-Zellen, sind Bestandteil des adaptiven, zellulären Systems. Die erworbene, humorale Abwehr funktioniert vor allem durch Antikörper, welche durch B-Lymphozyten gebildet werden (6). Zu den Komponenten der zellulären, angeborenen Abwehr gehören die Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen (1). Der Aufbau des zellulären Immunsystems ist schematisch in Abb. 1 dargestellt.

1.1.2 Zelluläre Bestandteile des Immunsystems

Zur zellulären Abwehr des Immunsystems gehören verschiedene Untergruppen von Leukozyten. All diese Populationen bilden sich aus omnipotenten Stammzellen (Abb. 1).

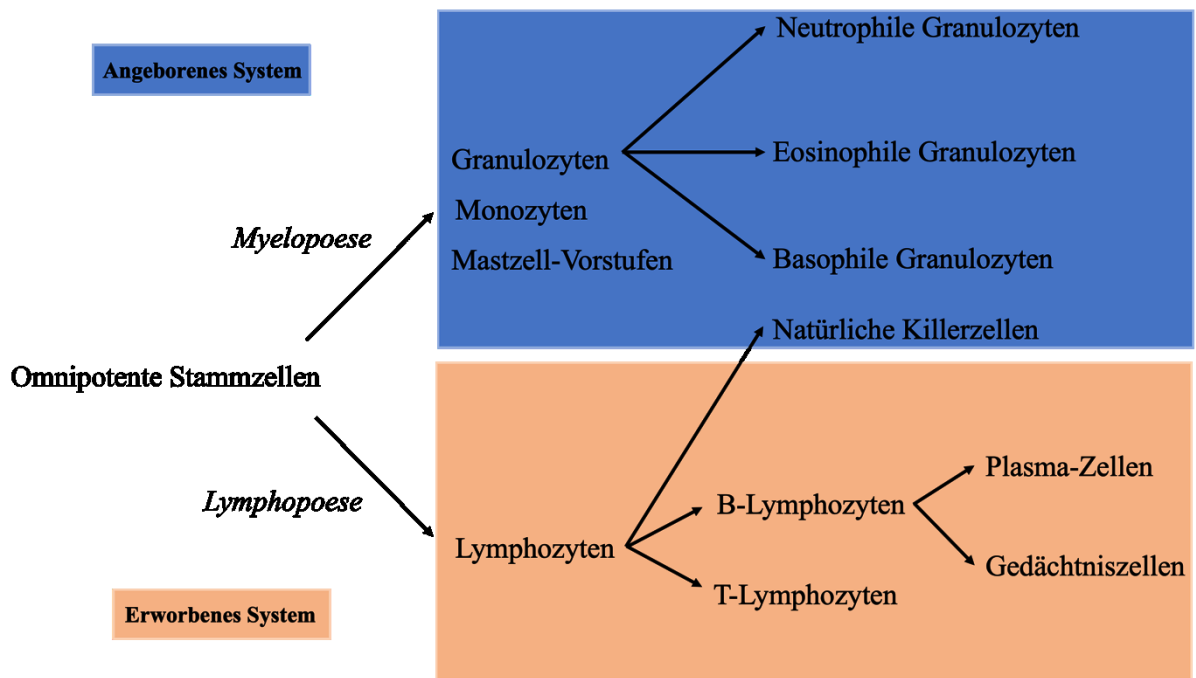


Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus des zellulären Immunsystems mit Einteilung der Leukozyten. Aus einer omnipotenten Stammzelle entstehen über die Myelopoese Granulozyten, Monozyten und Mastzell-Vorstufen. Die Granulozyten können weiterhin in Neutrophile, Eosinophile und Basophile unterschieden werden. Über die Lymphopoese entstehen aus omnipotenten Stammzellen Lymphozyten, die weiterhin differenziert werden in B- und T-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen. B-Lymphozyten können sich zu Plasma- und Gedächtniszellen ausbilden. Der blaue Kasten markiert das angeborene System, der orange Kasten das erworbene System (1,2,5–9).

Lymphozyten entstammen der Lymphopoese (Abb. 1, oranger Kasten) (2,7). Lymphozyten sind Bestandteil der adaptiven Abwehr und erhalten daher bei ihrer Entstehung einen individuellen Antigen-Rezeptor (2,8). B-Lymphozyten können zu Plasmazellen oder Gedächtniszellen differenziert werden. Durch ihre Antikörperproduktion bilden die B-Lymphozyten die Schnittstelle zur humoralen Abwehr. Weiterhin zählen Natürliche Killerzellen sowie mukosaassoziierte invariante T-Zellen zu den lymphoiden Zellen (2). Dabei gehören Natürliche Killerzellen im Gegensatz zu T- und B-Zellen zur angeborenen Abwehr (9). Aus der Stammzelle entstehen über die sogenannte Myelopoese Granulozyten, Monozyten und Mastzell-Vorstufen (Abb. 1, blauer Kasten).

Granulozyten aus der myeloischen Reihe bilden den größten Teil aller Leukozyten im humanen Blut. Sie enthalten Granula, die ihre biologische Funktion ausmachen (7). Zu unterscheiden sind eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten (Abb. 1, blauer Kasten). Diese reagieren unspezifisch und sind daher unmittelbar bei Antigenkontakt einsatzbereit (2,6).

Eosinophile Granulozyten sind vor allem für ihre Rolle bei der Bekämpfung von Parasiten sowie bei der Entstehung von bestimmten Erkrankungen, zum Beispiel beim Asthma bronchiale bekannt (10,11). Basophile Granulozyten sind, wie Mastzellen, an allergischen Reaktionen beteiligt. Außerdem sind sie ebenfalls Teil der Parasitenabwehr (11).

Die größte Gruppe der Granulozyten bilden die Neutrophilen. Diese sind für die Erregerabwehr verantwortlich. Die Mechanismen, die dazu genutzt werden, sind unter anderem die Phagozytose und der oxidative Burst (5,12).

Monozyten entstammen ebenfalls der myeloischen Reihe und können zu Makrophagen oder dendritischen Zellen reifen. Auch Monozyten sind zur Phagozytose befähigt (12–14).

Die prozentuale Verteilung der Populationen im Blut bei einem gesunden Menschen ist ca. (12):

- Eosinophile Granulozyten: 3%
- Basophile Granulozyten: <1%
- Neutrophile Granulozyten: 60%
- Lymphozyten: 30%
- Monozyten: 6%

1.1.3 Phagozytose und oxidativer Burst als zelluläre Abwehrmechanismen

Die Phagozytose und der oxidative Burst sind grundlegende Mechanismen des unspezifischen Immunsystems zur Bekämpfung von Infektionen. Diese werden vor allem durch Granulozyten, Monozyten und Makrophagen ausgeführt (5,12,13).

Bei der Phagozytose kommt es zur Aufnahme von Erregern in den Zellkörper der Phagozyten, indem die Erreger von der Zellmembran der Phagozyten umschlossen werden. Dabei entstehen sogenannte Phagosomen, welche sich von der Zellmembran abschnüren. Nach Verschmelzung mit den intrazellulären Lysosomen können die aufgenommenen Partikel nun beseitigt werden (15). Verstärkt wird dieser Mechanismus durch die Opsonierung, bei dem Antikörper oder Komplement an den Erreger binden und diesen so markieren (1,15). Eine zur Phagozytose fähige Zelle kann die Antikörper-markierten Zellen über einen Fc-Rezeptor erkennen (7). Weitere Rezeptoren zur Erkennung von Mikroorganismen sind Komplement-Rezeptoren, Typ-C-Lektin-Rezeptoren (zum Beispiel Dectin-1, Mannose-Rezeptoren) und Scavenger-Rezeptoren (5).

Der oxidative Burst, auch respiratorischer Burst genannt, beschreibt einen intrazellulären Abwehrmechanismus von neutrophilen Granulozyten oder Makrophagen, welcher während der Phagozytose stattfindet (16). Ziel ist es, den Stoffwechsel so zu verändern, dass toxische Metabolite produziert und phagozytierte Erreger abgetötet werden können. Dazu steigt der

zelluläre Sauerstoffverbrauch – der sogenannte Burst (5). Darüber hinaus haben Leukozyten noch andere Möglichkeiten zur Erregerabwehr, zum Beispiel die Senkung des pH-Werts, die Proteolyse, die Eisenbindung und die Neutrophil extracellular traps (NETs) (1,5).

1.2 Prinzipien der Leukozytenreduktion von Blutprodukten

1.2.1 Notwendigkeit der Leukozytenreduktion

Obwohl Leukozyten im zirkulierenden Blut grundlegender Bestandteil des menschlichen Immunsystems sind, werden diese Zellen im Rahmen von Blutspenden als Risikofaktor für verschiedene transfusionsassoziierte Erkrankungen angesehen (17–19). Daher gehört es zum medizinischen Standard, die Leukozyten vor der Transfusion von Blutprodukten wie Erythrozytenkonzentraten, Thrombozytenkonzentraten und Frischplasmapräparaten zu entfernen. Man unterscheidet dabei zwischen der Leukozytenreduktion und der Leukozytendepletion. Bei der Reduktion wird die Leukozytenzahl nur verringert. Bei der Depletion werden im Gegensatz dazu annähernd alle Leukozyten entfernt (20).

Je nach Vorgabe darf die Leukozytenzahl nach der Depletion Grenzwerte zwischen 1 und 5×10^6 Leukozyten nicht überschreiten, wobei in Deutschland weniger als 1×10^6 Leukozyten in Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten enthalten sein müssen (19,21,22). Durch moderne Techniken ist eine Reduktion der Leukozytenzahl auf weniger als 1×10^6 Leukozyten pro Konzentrat möglich (23). Dieses Vorgehen erhöht die Sicherheit von Blutproduktspenden. Insbesondere die Verträglichkeit der Präparate für den Empfänger wird dadurch verbessert. Vor allem drei Risiken können durch die Reduktion von Leukozyten in Blutprodukten minimiert werden (17–19):

- die Übertragung von Viren (zum Beispiel das Cytomegalie-Virus)
- die HLA-Alloimmunisation des Transfusionsempfängers
- die febrile nicht-hämolytische Transfusionsreaktion

Es wird zudem angenommen, dass weitere Risiken durch die Leukozytenreduktion vermindert werden können, auch wenn bisher nur wenige klinische Belege dafür vorliegen. Dazu gehören zum Beispiel die Übertragung des Epstein-Barr-Virus und die transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz. Außerdem soll die Mortalität sowie das Auftreten von Multiorganversagen reduziert sein (24,25). Dabei ist entscheidend, wie viele Leukozyten nach der Reduktion noch im Blutprodukt enthalten sind. Um sowohl die Alloimmunisation als auch die Virusübertragung zu vermindern, muss die Leukozytenzahl unter 50×10^6 liegen (26).

Weiterhin trägt die Verminderung der Leukozytenzahl zur qualitativen Verbesserung von gelagerten Erythrozytenkonzentraten bei (27). Insbesondere leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrate zeigen eine erhöhte osmotische Resistenz sowie eine erhöhte Glukoseaufnahme (28). Außerdem führt dieses Vorgehen zu einer deutlichen Reduktion des Auftretens der febrilen nicht-hämolytischen Transfusionsreaktion (29). Aufgrund der genannten Aspekte ist in Deutschland eine generelle Leukozytendepletion für die meisten Blutprodukte verpflichtend vorgeschrieben (23,30).

1.2.2 Technische Möglichkeiten zur Leukozytenreduktion

Zur Verminderung der Leukozytenzahl eines Blutprodukts können verschiedene Verfahren angewendet werden. Dazu gehören die Zentrifugation, die Sedimentation, die Zellwaschung und das Einfrieren und Auftauen (31,32).

Bei der Zentrifugation von Blutprodukten werden die unterschiedlichen Dichten und Größen der Blutbestandteile genutzt. Es kommt zur Ausbildung von drei Schichten. Da Erythrozyten eine höhere Dichte als Thrombozyten und Leukozyten aufweisen, sinken diese bei der Zentrifugation ab und bilden die untere Schicht. Das zellfreie Plasma bildet die obere Schicht, während die Thrombozyten und Leukozyten sich dazwischen befinden (Abb. 2) (19). Diese Schicht wird auch Buffy Coat genannt. Ein Buffy Coat besteht demnach hauptsächlich aus Leukozyten und Thrombozyten. Entfernt man das Plasma und die Erythrozyten, um diese weiter zu verwerten, bleibt der Buffy Coat zurück (33).

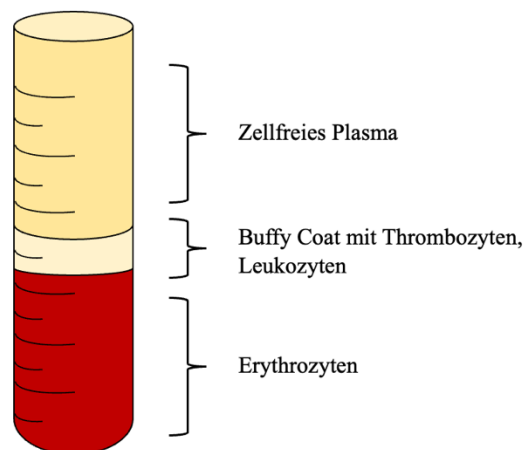


Abb. 2: Schematische Darstellung einer Blutprobe im Zentrifugenröhrchen oder Blutbeutel nach der Zentrifugation. Oben befindet sich das zellfreie Plasma (gelb). Die mittlere Schicht bildet der Buffy Coat (helles gelb), welcher Leukozyten und Thrombozyten enthält. Die untere Schicht bilden die Erythrozyten (rot). (Eigendarstellung)

Für die Aufteilung werden Mehrfachbeutelssysteme genutzt: Nach der Zentrifugation wird zuerst das Plasma in einen separaten Beutel nach oben abgepresst, danach folgt das Ablassen der Erythrozyten nach unten, bis der Buffy Coat übrigbleibt (30).

Der Sedimentation mittels Schwerkraft liegt der gleiche Mechanismus zugrunde, sodass sich die gleichen drei Schichten ausbilden wie bei der Zentrifugation. Grundlage dafür ist die Geldrollenbildung oder auch Rouleau-Bildung der Erythrozyten (34). Darunter versteht man die perlschnurartige Anordnung von Erythrozyten durch Adhäsionskräfte (35). Dieser Prozess kann durch die Zugabe von Sedimentationsbeschleunigern wie Dextran unterstützt werden (31).

Die Zellwaschung beruht ebenfalls auf den unterschiedlichen Dichten der Blutbestandteile. Bei dieser Methode wird das Blutprodukt mit isotonischer Kochsalzlösung gereinigt, während es zentrifugiert wird (31,36).

Eine weitere Möglichkeit zur Leukozytenreduktion ist das Einfrieren von Blutprodukten bei -60°C oder geringerer Temperatur. Dabei entstehen Eiskristalle in den Leukozyten. Wird das Blut wieder aufgetaut, zerstören diese Eiskristalle die Zellmembran. Um den Effekt bei Erythrozyten zu vermeiden, wird Glycerol hinzugegeben. Nach dem Auftauen erfolgt ein Waschungsprozess, um die Leukozytenreste und das Glycerol zu entfernen (31,37).

1.2.3 Filtration

Eine weitere Methode zur Leukozytenreduktion stellen Leukozytendepletionsfilter dar. Leukozytendepletionsfilter werden in Tiefen- und Siebfilter unterschieden. Der Aufbau und die verwendeten Fasern in den Filtern beeinflussen den Filtrationsablauf: Während die Fasern der Tiefenfilter eher ungeordnet sind, bestehen Siebfilter aus gewebten Strukturen (32). In Abb. 3 sind beide Filtertypen schematisch dargestellt. Beide Filter bestehen aus mehreren Schichten synthetischer Fasern, meist aus Polyester oder Polyurethan (38).

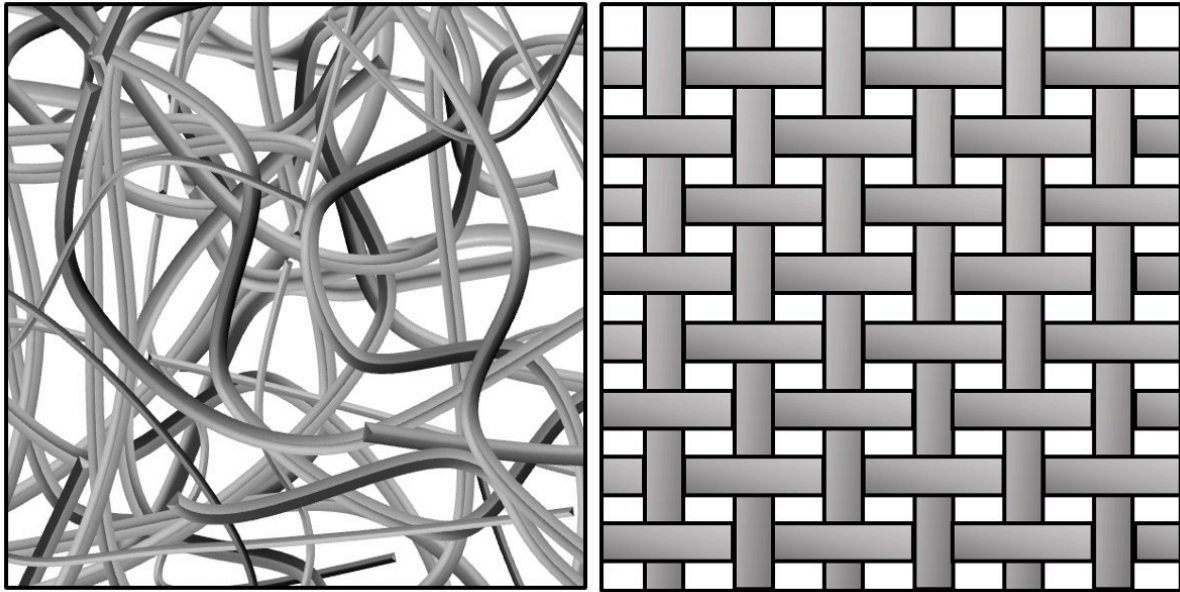


Abb. 3: Schematische Darstellung eines Tiefenfilters (links) und eines Siebfilters (rechts). Dargestellt sind die ungeordneten Fasern des Tiefenfilters sowie die gewebten Strukturen des Siebfilters. Angelehnt an Singh et al. (32).

Die Filterstruktur und das Material beeinflussen die Filtrationsmechanismen. Diese Mechanismen sind vor allem (19):

- die Adhäsion von Leukozyten an die Filterfasern
- die Adhäsion von Leukozyten an Thrombozyten
- der Siebeffekt des Filters

Die größte Rolle für die Leukozytenreduktion durch Filtration spielt die Adhäsion. Unter Adhäsion versteht man das Aneinanderhaften zweier Materialien (20). Die Adhäsion von Leukozyten an Gewebe oder Oberflächen wird durch verschiedene Proteine, Liganden, Rezeptoren und durch Chemotaxis katalysiert (31,39,40). Bei der Filtration wird die Adhäsion von der Ladung der Leukozyten beeinflusst: Durch Van-der-Waals-Kräfte und elektrostatische Wechselwirkungen können die negativ geladenen Zellen am positiv geladenen Filtermaterial haften. Die Beschaffenheit der Oberfläche ist ebenfalls entscheidend: Zum einen ist die Anzahl an Faserkreuzungen ausschlaggebend: Je mehr Faserkreuzungen auftreten, desto mehr Leukozyten können haften (32,41). Gleichzeitig steigt mit steigender Anzahl an Faserkreuzungen auch der Flusswiderstand. Daher muss ein Optimum zwischen der Haftung und der Widerstandserhöhung gefunden werden (31). Zum anderen muss für die optimale Filtrationswirkung an der Oberfläche ein ideales Verhältnis zwischen Hydrophilie und Hydrophobie geschaffen werden, da Leukozyten eher an hydrophilen Oberflächen haften. Erythrozyten und Thrombozyten bevorzugen eine hydrophobe Umgebung. Ist die Umgebung jedoch zu hydrophil, können auch Leukozyten nicht effizient haften (32).

Ein weiterer wichtiger Mechanismus ist die Adhäsion von Leukozyten an Thrombozyten. Die Thrombozyten haften am Filtermaterial und tragen durch die Interaktion zur Leukozytenreduktion bei. Viele Studien haben gezeigt, dass die Adhäsion von Leukozyten in Anwesenheit von Thrombozyten verbessert wird und somit auch der Filtrationserfolg positiv beeinflusst wird (31,42,43).

Der Siebeffekt der Filter wird durch die Porengröße beeinflusst: Je kleiner die Poren, desto schlechter können Leukozyten das Filtermaterial passieren und bleiben dadurch im Filter zurück. Erythrozyten jedoch können auch noch kleinere Durchmesser durchfließen (31,41). Mit zunehmenden Filtrationsvolumen kann es zum Verstopfen der Poren kommen, sodass der Flusswiderstand steigt. Dies kann zur Hämolyse von roten Blutzellen führen. Auch der angewandte hydrostatische Druck ist wichtig: Ist er zu niedrig, entsteht kein Zellfluss; ist er zu hoch, kommt es zur Hämolyse (31,44).

Weitere Faktoren, die den Filtrationserfolg beeinflussen, sind die Temperatur, die Anteile der jeweiligen Zellen im Blutpräparat sowie der Zeitpunkt der Filtration nach der Blutspende (19). Die Filtration ist eine effektive Möglichkeit zur Leukozytenreduktion (32,45). Allerdings können nicht alle Leukozyten restlos entfernt werden. Um eine Proliferation der Zellen zu verhindern, sollen Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrate vor der Transfusion an immunkompromittierte Empfänger mit 30 Gy bestrahlt werden (22,46).

1.3 Verwendung von Leukozyten in Therapie und Forschung

1.3.1 Depletionsfilter als potenzielle Leukozyten-Quelle

Aufgrund ihrer leichten Verfügbarkeit sind Leukozytendepletionsfilter schon länger im Fokus wissenschaftlichen Interesses und stellen eine potenzielle alternative Zellquelle dar. Die Filter und die daraus gewonnenen Immunzellen könnten die Grundlage für viele Forschungsvorhaben bilden, zum Beispiel für die Grundlagenforschung, als Ersatz für Tierversuche oder zur Weiterentwicklung von Zelltherapien (47).

Eine weitere potenzielle Anwendungsmöglichkeit von Filtern ist die Gewinnung von hämatopoetischen Stammzellen, wie sie beispielsweise in der Leukämie-Therapie benötigt werden. Im Vergleich zu Standardmethoden ist diese Technik nebenwirkungsfrei (48,49).

Mehrere Arbeitsgruppen haben bereits Methoden etabliert, um Leukozyten aus Filtern durch Rückspülung zu gewinnen. Die Zellen, die aus den Filtern isoliert wurden, waren lebens- und funktionsfähig. Dabei wurden unterschiedliche Flüssigkeiten und Zusätze für die Rückspülung verwendet, die mittels Spritze entgegen der Flussrichtung des Filters appliziert wurden (50–58). Es wurden verschiedene Filtertypen getestet. Neben den unterschiedlichen

Rückspülmedien gibt es außerdem verschiedene technische Ansätze der Zellisolierung. Zwei Arbeitsgruppen verglichen die Standardspülmethode mittels Spritze mit anderen Spülvorgängen, zum Beispiel mit der Waschung eines Filters, der Verwendung einer Vakuumpumpe oder mit einem System, bei dem das Spülvolumen mit Gas bewegt wurde (54,58). Die Anzahl der aus Filtern gewonnenen Zellen durch die verschiedenen Methoden variierte dabei zwischen $2,67 \times 10^8$ und $1,01 \times 10^9$ Leukozyten (50–52,56–58).

1.3.2 Anwendung von Leukozyten im extrakorporalen Immunsupportsystem ARTICE®

1.3.2.1 Die Sepsis

Das menschliche Immunsystem kann auch dysfunktional agieren. Ein Beispiel für eine derartige Situation ist die Sepsis. Laut Definition liegt das Krankheitsbild einer Sepsis vor, wenn eine dysfunktionale Antwort des Immunsystems auf eine Infektion zu einer Organdysfunktion führt, die lebensbedrohlich ist (59). Jedes Jahr erkranken fast 50 Millionen Menschen an einer Sepsis (60). Die Organdysfunktionen werden anhand des Sequential Organ Failure Assessment-Scores (SOFA-Score) bewertet. Dieser umfasst sechs Kriterien, die die Funktion verschiedener Organsysteme abdecken. Dazu gehören die Lunge, das Herz-Kreislauf-System, die Blutgerinnung, die Leber, die Nieren und das ZNS. Je nach Schweregrad werden pro Kriterium bis zu vier Punkte vergeben. Wenn mehr als ein Punkt vergeben wird, gilt dies als Dysfunktion (61,62).

Zur Diagnostik der Sepsis gehören neben der Einschätzung der Organdysfunktion auch die Erregerdiagnostik sowie die Fokussuche (63,64). Die Säulen der Therapie sind vor allem die zeitnahe antiinfektive Therapie, die Kreislaufstabilisierung und die Fokussanierung (65–67).

Tritt bei einer Sepsis auch Kreislaufversagen auf, spricht man von einem septischen Schock. Dazu gehört ein Serum-Laktat-Wert von über zwei mmol/l sowie eine Katecholamin-pflichtige Hypotension trotz eines adäquaten Volumenstatus. Die Letalität des septischen Schocks liegt bei über 40% (68).

1.3.2.2 Prinzip des ARTICE®-Systems

Das extrakorporale Immunsupportsystem ARTICE® der Firma ARTCLINE GmbH (Rostock, Deutschland) ist ein Blutreinigungsverfahren, welches zurzeit im Rahmen einer klinischen Multicenterstudie bei Patienten im septischen Schock angewendet wird.

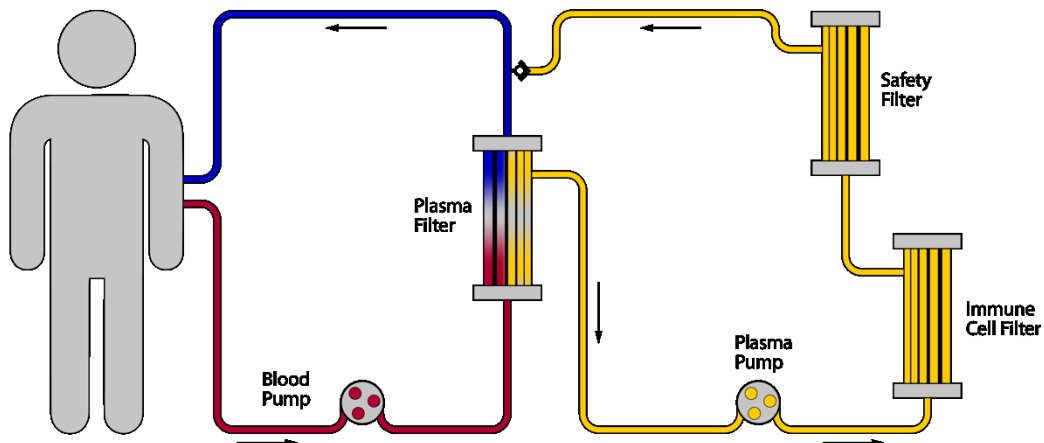


Abb. 4: Schematische Darstellung des ARTICE® -Verfahrens. Das Blut des Patienten wird im Plasmafilter in das Blutplasma und die korpuskulären Blutbestandteile aufgetrennt (roter Kreislaufteil). In einem 2. Kreislauf wird das Plasma mit Spendergranulozyten in Kontakt gebracht (gelber Kreislauf). Nachdem die Granulozyten wieder im Immune Cell Filter aus dem Plasma entfernt wurden, wird dieses wieder mit dem Patientenblut vereinigt und dem Patienten zugeführt (blauer Kreislaufteil). Zur Verfügung gestellt von der ARTCLINE GmbH.

Im Rahmen der ARTICE®-Behandlung wird das Blutplasma des Patienten von den restlichen Blutbestandteilen in einem extrakorporalen Kreislauf separiert (Abb. 4, roter Kreislaufteil) und in einem 2. Kreislauf mit Immunzellen eines gesunden Spenders (überwiegend neutrophile Granulozyten) in Kontakt gebracht (Abb. 4, gelber Kreislauf). Danach wird das gereinigte Plasma wieder mit dem Patientenblut vereinigt und dem Patienten zugeführt (Abb. 4, blauer Kreislaufteil). Durch diese Vorgehensweise wird verhindert, dass die Spenderzellen in den Kreislauf des Patienten gelangen (69).

In einer klinischen Studie der Phase I/II zur Sicherheit und Wirksamkeit der Verwendung von Granulozytenspenden in extrakorporalen Blut-Zirkulationsgeräten in Zusammenarbeit mit der Universität Rostock mit insgesamt 20 Patienten (zwei Teilstudien mit je zehn Patienten) konnte gezeigt werden, dass nach zwei Therapiedurchläufen mit dem System unter anderem die bakterielle Endotoxinkonzentration sowie die Konzentrationen von CRP und PCT im Plasma des Patienten signifikant sanken. Außerdem konnte die Noradrenalin-Dosis signifikant reduziert werden, da sich unter der Behandlung die Schocksituation verbesserte. Die

Mortalitätsrate war geringer im Vergleich zu der Vorhersage verschiedener Scores (APACHE II, SAPS II) (70–73). Im Jahr 2022 begann eine weitere klinische Studie mit 142 geplanten Patienten im septischen Schock in mehreren deutschen Zentren als randomisierte kontrollierte Multicenterstudie.

Bei Patienten mit dem Krankheitsbild des septischen Schocks agiert die körpereigene Immunabwehr dysfunktional. Hierbei tritt zu Beginn häufig eine Überreaktion auf, auf die sehr schnell eine Immunsuppression folgt, die durch eine Lymphopenie und eine niedrige HLA-DR-Expression auf Monozyten gekennzeichnet ist (74–77). Dieser Zustand wird als Immunparalyse bezeichnet (78).

Grundlegende Überlegung beim ARTICE®-Verfahren ist, dass die körpereigene Abwehr von „gesunden“ Granulozyten eines Spenders temporär übernommen werden könnte und eine Reaktivierung des Patienten-eigenen Immunsystems erfolgt. Zur Behandlung der Immunparalyse werden daher Granulozytenkonzentrate von gesunden Spendern eingesetzt. Wenn diese Zellen in Kontakt mit dem Plasma des Patienten gelangen, gehen die Zellen ihrer Funktion nach und beginnen die Reinigung des Plasmas mittels der beschriebenen Erregerabwehrmechanismen. Des Weiteren setzen sie Zytokine frei und wirken hierüber immunmodulierend (69).

Aktuell erfolgt die Gewinnung von Granulozytenkonzentraten mit AB0-Kompatibilität, indem Granulozyten eines gesunden Spenders mit G-CSF und Dexamethason mobilisiert werden. Anschließend wird die Sammlung mittels Apheresetechniken durchgeführt (79,80). Diese enthalten mindestens $1,25 \times 10^{10}$ neutrophile Granulozyten in 200 bis 500ml Volumen. Durch diesen Prozess sind die Probandenrekrutierung und Spendenvorbereitung komplex und daher sehr aufwendig.

2 Zielsetzung

Leukozyten sind ein geeignetes Zellmodell für die wissenschaftliche Forschung und klinische Anwendung, jedoch kann der Bedarf an Leukozyten nach wie vor nicht mit herkömmlichen Blutprodukten wie zum Beispiel Granulozytenpräparaten gedeckt werden. Außerdem sind die Präparate aufgrund der Komplexität der Probandenrekrutierung schwer zu beschaffen. Daher ist es dringend erforderlich, eine alternative Quelle für Leukozyten zu finden. Leukozytendepletionsfilter stellen dabei eine mögliche Quelle zur Zellgewinnung dar. Leukozytendepletionsfilter werden für die Herstellung leukozytenreduzierter Blutprodukte verwendet, um das Risiko von transfusionsbedingten Reaktionen zu verringern. Mehr als 90% der Leukozyten aus einer Vollblutspende werden in den Filtern zurückgehalten, während Erythrozyten, Thrombozyten und Plasma durch den Filter fließen können. Da die Filter als Abfallprodukt in der Transfusionsmedizin auftreten, könnten sie eine nachhaltige Alternative zu herkömmlichen Methoden zur Leukozytengewinnung darstellen. Die Verwendung als Forschungsressource wurde bereits beschrieben. Zudem wurden bereits mehrere Methoden zur Leukozytengewinnung aus Filtern etabliert. Diese scheinen noch nicht voll ausgenutzt zu werden.

Diese Dissertation soll einen Überblick über die Verwendung von Leukozytendepletionsfiltern in der Forschung zur Gewinnung von Leukozyten geben und verschiedene Methoden zur Gewinnung von funktionsfähigen Leukozyten aus dem Filter untersuchen und optimieren. Die zurückgewonnenen Leukozyten sollen hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, ihrer Vitalität und ihrer Funktionalität analysiert werden, um zu prüfen, ob die Zellen für verschiedene Bereiche der Forschung und klinischen Anwendung, wie z.B. im ARTICE® -Verfahren, genutzt werden können.

3 Materialien und Methoden

Im Folgenden werden die Vorgehensweise dieser Arbeit, die verwendeten Materialien sowie die Methoden beschrieben. Eine ausführliche Referenz der verwendeten Geräte, Reagenzien und Chemikalien mit Produktnamen und Herstellern befindet sich im Anhang.

3.1 Humane Blutprodukte

3.1.1 *Buffy Coat*

In der vorliegenden Arbeit wurden Buffy Coats als Leukozyten-Quelle verwendet. Diese wurden von der Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung gestellt und dort, wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, mittels Zentrifugation hergestellt. Anschließend wurden die Buffy Coats unbewegt, lichtgeschützt und bei Raumtemperatur gelagert. Die Verarbeitung der Buffy Coats erfolgte innerhalb von 24h nach der Herstellung.

3.1.2 *Verwendete Leukozytendepletionsfilter*

Weltweit sind viele verschiedene Depletionsfilter von diversen Herstellern verfügbar (47). Jeder davon bietet Vor- und Nachteile. Beispielsweise unterscheiden sie sich in der Art des Gehäuses. Es gibt Filter, die von einer harten Schale umgeben sind, sodass sich diese beim Filtrationsprozess nicht ausdehnen. Daneben gibt es auch Filter, die eine weiche, dehnbare Hülle besitzen.

Die Auswahl der Depletionsfilter in dieser Arbeit erfolgte nach deren Verfügbarkeit. Es wurden Hartschalenfilter verwendet, um das Spülen der Filter zu ermöglichen. Im Folgenden werden die verwendeten Filter vorgestellt.

3.1.2.1 DONOpack (Lmb Technologie)

Der Filter DONOpack der Firma Lmb Technologie GmbH (Schwaig, Deutschland) besitzt eine harte Schale aus Polycarbonat. Ein Foto des Filters ist in Abb. 5 dargestellt. Dieser Filter ist vor allem für Vollblutspenden geeignet. Nach der Filtration soll die Leukozytenzahl im entstehenden Filtrat weniger als 1×10^6 betragen. Dabei sollen mehr als 90% der Erythrozyten gewonnen werden können (81). Das Füllungsvolumen des Filters beträgt 40ml. Die Filtrationsrichtung ist auf dem Gehäuse mit Pfeilen angegeben (in Abb. 5 nicht dargestellt).



Abb. 5: Dargestellt ist ein DONOpack-Filter der Firma Lmb Technologie GmbH. Dieser Filter besitzt eine runde Form und eine harte Schale aus Polycarbonat.

3.1.2.2 Imugard[®] III RC (Terumo BCT)

Der Filter Imugard[®] III RC von Terumo BCT (Lakewood, USA) ist ebenfalls ein Hartschalenfilter und hat ein Füllungsvolumen von 40ml. Ein Foto des Filters ist in Abb. 6 dargestellt. Dieser Filter ist für die Filtration von Vollblutspenden und Erythrozytenkonzentraten geeignet. Der Imugard[®] III RC-Filter besteht innen aus mehreren Schichten Polyurethan. Die Technologie des Systems ist patentiert. Die Porenverteilung und die Porendichte und die damit einhergehende hohe Porosität des Materials soll für eine stabile Filtration von Mikroaggregaten und Leukozyten sorgen (82). Der Filtrationseffekt soll vor allem durch die Porenverteilung bedingt sein, während Zell-Material-Interaktion nur eine geringere Rolle spielen. Nach Angaben des Herstellers verbleiben durchschnittlich weniger als 2×10^5 Restleukozyten im Filtrat. Dabei können mehr als 90% der Erythrozyten des Ausgangsprodukts gewonnen werden (82).



Abb. 6: Dargestellt ist ein Imugard[®] III RC-Filter der Firma Terumo BCT. Dieser Filter besitzt eine harte Schale. Die Beschriftung des Filters gibt die Filtrationsrichtung an.

3.2 Entwicklung der Methodik zur Rückgewinnung von Leukozyten

3.2.1 Filtrationsablauf

Zu Beginn wurde das Volumen des Buffy Coats bestimmt, um die Menge des zur Verfügung stehenden Materials zu ermitteln. Dafür wurde angenommen, dass die Dichte des Blutes 1 g/cm^3 beträgt. Über die Gewichtsmessung des Buffy Coats mit einer Waage und nach Abzug des Leerbeutelgewichts konnte das Volumen berechnet werden. Anschließend wurde die Zellzahl mit dem Hämatologie-Analysator Sysmex KX-21N gemessen. Auf diese Weise konnte die Gesamtzellzahl eines Buffy Coats berechnet werden.

Danach erfolgte die Verbindung des Filters mit dem Buffy Coat-Beutel über ein Schlauchschweißgerät des Herstellers Terumo BCT. Unterhalb des Filters wurde, sofern nicht vorhanden, ein Auffangbeutel angebracht, um das Filtrat aufzufangen. Um die Ergebnisse vergleichbar zu machen, wurde auf die gleiche Schlauchlänge des Schlauchsystems oberhalb des Filters bei gleichem Filtertyp geachtet. Dies waren bei den DONOpack-Filtern jeweils 46cm. Diese Länge wurde zufällig festgelegt. Bei den Terumo-Filtern wurde die vom Hersteller vorgegebene Länge von 35cm genutzt.

3.2.2 Bestimmung der Filtrationsdauer und der Filtrationsausbeute

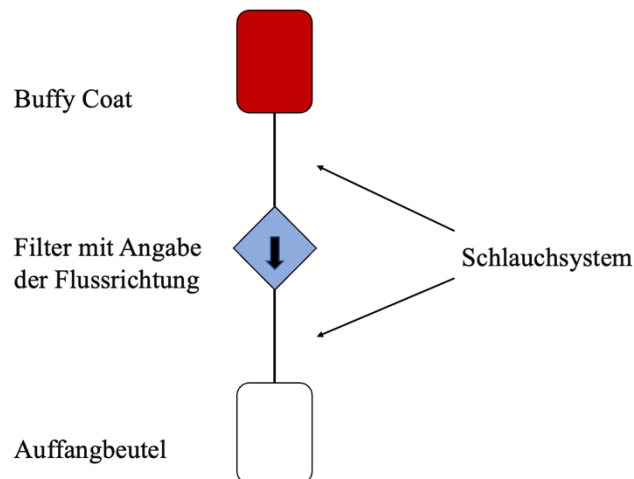


Abb. 7: Schematische Darstellung eines Filtrationsvorgangs. Der Buffy Coat in einem Beutel wird mit dem Filter verbunden. Unterhalb des Filters befindet sich ein Auffangbeutel, in dem das Filtrat aufgefangen wird.

Zu Beginn der Filtration wurde das Gewicht des leeren Filters und des leeren Auffangbeutels bestimmt. Anschließend wurde das Buffy Coat-Beutel-System an einem Infusionsständer aufgehängt. Der Filtrationsvorgang wird schematisch in Abb. 7 dargestellt. Nachdem das Schlauchsystem geöffnet wurde, begann der Filtrationsprozess. Mit einer Stoppuhr wurde die

Zeit bis zur vollständigen Entleerung des Buffy Coats gemessen. Es wurde festgelegt, dass jeder Buffy Coat für insgesamt zehn min gefiltert werden sollte.

Nach Beendigung des Filtrationsvorgangs wurden der Filter und der Auffangbeutel getrennt. Anschließend erfolgte eine Gewichtsmessung des Filters und des Auffangbeutels, sowie eine Probenentnahme aus dem Beutel, um die Zellzahl am Sysmex KX-21N zu messen.

3.2.3 Spülung in und entgegen der Flussrichtung

Nach Entfernung des Buffy Coat-Beutels wurde der genutzte Filter vier Mal manuell mit 50ml 0,9% NaCl in Flussrichtung gespült (Abb. 8, linkes Bild). Das Ziel war dabei herauszufinden, ob durch Spülung in Flussrichtung bereits Leukozyten herauslösbar sind. Dafür wurden 50-ml-Spritzen mit Luer-Lock-Ansatz verwendet, welche an den Schlauch des Filters angeschlossen werden konnten. Analog zur Spülung in Flussrichtung wurde anschließend entgegen der Flussrichtung des Filters gespült (Abb. 8, rechts). Dabei wurden ebenfalls vier Mal 50ml 0,9% NaCl verwendet.

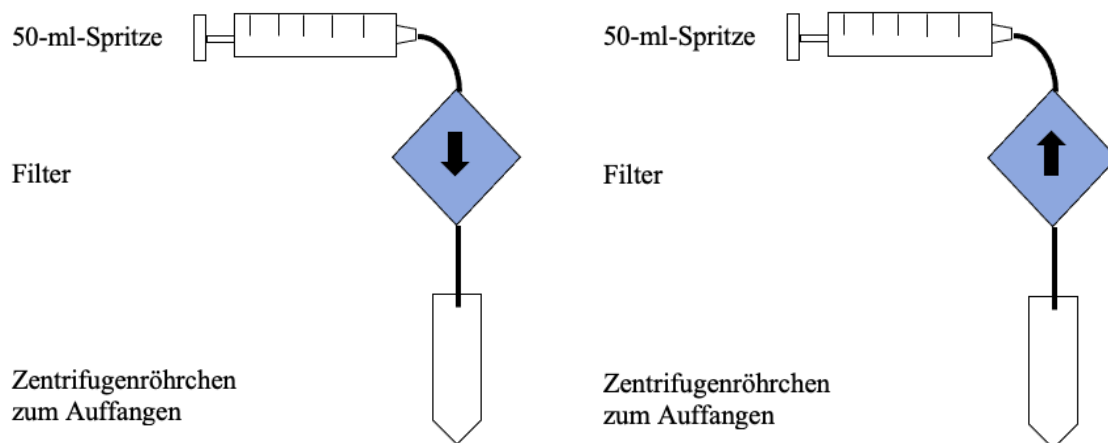


Abb. 8: Schematische Darstellung der Spülung eines Leukozytendepletionsfilters in Flussrichtung (links) und entgegen der Flussrichtung (rechts).

Danach erfolgte die Zellzahlbestimmung aller Proben am Sysmex KX-21N. Mittels serologischer Pipette wurde das Volumen der Spülungen bestimmt. Über die Ergebnisse der Messung mit dem Sysmex KX-21N ließ sich die absolute Zellzahl und somit der prozentuale Anteil der Leukozyten des Ausgangs-Buffy Coats in der Spülung bestimmen. Anschließend erfolgte die Vitalitätsanalyse mittels NucleoCounter[®], die durchflusszytometrische Bestimmung der Phagozytose- und Oxyburst-Rate sowie die Anfertigung eines Blutausstrichs.

3.2.4 Dissoziation mit Trypsin

Trypsin ist ein Enzym, welches im menschlichen Organismus durch den exokrinen Teil des Pankreas ausgeschüttet wird. Da Trypsin in seinem aktiven Zentrum die Aminosäure Serin besitzt, wird es auch als Serinprotease bezeichnet. Es spaltet Proteinverbindungen, in denen Lysin oder Arginin die Carboxylgruppe liefern (83).

In der wissenschaftlichen Anwendung ist Trypsin eines der gebräuchlichsten Enzyme zur Ablösung von adhären Zellen. Weiterhin wird es zur Gewebedissoziation verwendet (84). Dafür muss zuvor die optimale Inkubationszeit bestimmt werden, da Trypsin potenziell zellmembranschädigend wirkt. Im menschlichen Plasma ist physiologischerweise α 1-Antitrypsin vorhanden, welches Trypsin inhibiert, weshalb das Plasma aus der Probe entfernt werden muss, bevor Trypsin verwendet werden kann (85).

Für diese Arbeit wurde tierisches 0,25% Trypsin verwendet. Dieses war mit 2,21mM EDTA und Phenolrot versetzt. Zur klinischen Anwendung muss es durch rekombinante Varianten ersetzt werden.

Ziel des Versuchs war, die optimale Inkubationszeit für die Verwendung von Trypsin zu bestimmen. Mit der ermittelten optimalen Inkubationszeit wurde in der darauffolgenden Versuchsreihe eine durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung der Fähigkeit zur Phagozytose und zum oxidativen Burst durchgeführt.

Zu Beginn der Versuchsreihe wurde das Enzym auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Zusätzlich wurden auch 0,9% NaCl sowie der Buffy Coat und die jeweils verwendeten Filter auf die gleiche Temperatur erwärmt.

Nachdem der Buffy Coat über einen Filter gegeben wurde (Abb. 7), wurde dieser in Flussrichtung zweimalig mit 50ml 0,9% NaCl gespült, um das Plasma aus dem Filter zu entfernen (Abb. 8, linkes Bild). Anschließend wurden die Filter mit jeweils 40ml 0,25% Trypsin (1X) versetzt und im Brutschrank bei 37°C für zehn, 15, 20 oder 25min inkubiert. Um eine optimale Verteilung im Filter zu gewährleisten, wurde ein Rüttler genutzt, auf dem der Filter während der Inkubation lagerte. Der Rüttler bewegte sich mit einer Kreisbewegung von ca. 5U/min. Nach Ablauf der Zeit wurde der Filter mit 50ml 0,9% NaCl und 50ml Plasma (Fresh Frozen Plasma, FFP) entgegen der Flussrichtung gespült (Abb. 8, rechtes Bild). Das dabei aufgefangene Volumen wurde bei 400xg für zehn min zentrifugiert, um den Überstand mit zellschädigendem Trypsin zu entfernen. Anschließend wurde die Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung durchgeführt. Eine Stunde nach dem 1. Spülschritt entgegen der Flussrichtung wurde der Filter erneut mit 85ml 0,9% NaCl sowie 50ml Plasma gespült, ebenfalls entgegen der Flussrichtung. Die Zellzahl wurde auch hier bestimmt. Die Filter wurden

bis zum nächsten Tag bei 37°C unbewegt im Brutschrank gelagert. Es erfolgte die Spülung am Folgetag mit zwei Mal 50ml 0,9% NaCl und im Anschluss die Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung. Zudem wurden Blutausstriche aus allen Spülschritten angefertigt. Zusätzlich wurde die Reaktion eines ungefilterten Buffy Coats auf Trypsin im Volumenverhältnis 1:1 untersucht. Dafür wurde eine Probe des Buffy Coats mit Trypsin versetzt und für die oben genannten Zeiten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgten die Zellzahlbestimmung am Sysmex KX-21N, die Vitalitätsbestimmung, ein Blutausstrich sowie die durchflusszytometrischen Analysen.

3.2.5 Dissoziation mit Accutase

Accutase wird, wie Trypsin, in der Zellkultur zur Ablösung von adhären Zellen verwendet. Dabei weist es eine geringere zytotoxische Wirkung als Trypsin auf. Accutase besteht aus einer Mischung aus proteolytisch und kollagenolytisch wirksamen Enzymen (86,87). In diesem Versuch wurde sowohl Accutase der Firma Corning (Manassas, USA) als auch der Firma Capricorn Scientific (Ebsdorfergrund, Deutschland) genutzt. In beiden Fällen wurde Accutase in Dulbecco's PBS (ohne Calcium und Magnesium) gelöst und enthielt 0,5mM EDTA sowie Phenolrot.

Die Verwendung von Accutase erfolgt in der vorliegenden Arbeit analog zu Trypsin. Es wurde ebenfalls die effektivste Inkubationszeit bestimmt. Mit dieser wurde anschließend eine Bestimmung der Phagozytose- und Oxyburst-Fähigkeiten durchgeführt. Ergänzend wurde die Reaktion eines ungefilterten Buffy Coats auf Accutase betrachtet.

Der Unterschied zu Trypsin bestand lediglich in der Handhabung der Accutase. Die Hersteller empfehlen die Verwendung von Accutase, wenn diese auf Raumtemperatur temperiert ist. Für die Inkubation kann aber eine Umgebungstemperatur von 37°C genutzt werden. Außerdem sollte mit magnesium- und calciumfreien Lösungen gearbeitet werden, zum Beispiel mit PBS (86,88). Daher wurden nur der Buffy Coat und die Spülflüssigkeit auf 37°C erwärmt. Es wurde Dulbecco's PBS (ohne Magnesium und ohne Calcium) zum Spülen genutzt. Die Inkubation wurde bei 37°C im Brutschrank auf dem Rüttler mit ca. 5U/min durchgeführt.

3.2.6 Thrombozytenreduktion des Buffy Coats

Es wurde eine Versuchsreihe zum Einfluss der Reduktion der Thrombozytenzahl des Ausgangs-Buffy Coats durchgeführt. Dafür wurde ein Buffy Coat vor der Filtration auf drei 50ml-Zentrifugenröhrchen mit gleichen Volumina aufgeteilt und bei 300xg für fünf min zentrifugiert. Im Überstand setzten sich dabei Thrombozyten ab. Dieser wurde entfernt und in der einen Versuchsreihe mit FFP, in der anderen mit 0,9% NaCl ersetzt. Dann wurden alle

Anteile wieder zusammengeführt und gründlich durchmischt. Danach wurde der thrombozytenreduzierte Buffy Coat erneut auf drei Beutel aufgeteilt und über jeweils drei Filter filtriert. Diese wurden dann in beide Richtungen gespült. Anschließend wurden die Zellzahlen bestimmt und jeweils ein Blutaussstrich angefertigt.

3.3 Standarduntersuchungsmethoden zur Beurteilung der Leukozyten-Qualität

3.3.1 Zellzahlbestimmung mit dem Sysmex KX-21N

Die Bestimmung der Leukozytenanzahl erfolgte mit dem Sysmex Hämatologie-System KX-21N (Norderstedt, Deutschland). Das Gerät bestimmt die Konzentration der Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten. Außerdem erlaubt das Gerät die Differenzierung zwischen Monozyten, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten, jedoch ist dies bei einer starken Verdünnung nur limitiert möglich. Zusätzlich werden unter anderem auch MCV, MCH und MCHC bestimmt.

Das Messprinzip des Geräts basiert auf der Änderung der Leitfähigkeit (89). Die Blutprobe wird automatisch mit einer leitenden Flüssigkeit verdünnt. Danach kommt die Probe in Kontakt mit Kapillaren, über die ein konstanter Strom fließt. Je nach Größe der Zelle kommt es zu einer Spannungsänderung und dadurch zu einer Änderung des elektrischen Widerstands. Diese Änderung ist proportional zur Größe der Zelle. Nach dem Verstärken und Aufsummieren der gemessenen Signale können diese ausgewertet werden. Zellfragmente oder elektrisches Rauschen können herausgefiltert werden, wenn sie die definierte Grenze nicht überschreiten. Für die Messung der Leukozyten, welche nach dem gleichen Prinzip erfolgt, müssen vorher die Erythrozyten mit dem Reagenz Stromatolyser-WH lysiert werden. Dabei kommt es zu einer Schrumpfung der Leukozyten (89). Gemessen wird die Anzahl in der Einheit $\times 10^9/l$. Mit Hilfe der bekannten Volumina kann die absolute Zellzahl berechnet werden, um Ergebnisse vergleichbar zu machen.

3.3.2 Vitalitätsbestimmung mit dem NucleoCounter[®] NC-200[™]

Zur Bestimmung des Einflusses der Filtration auf die Vitalität der gewonnenen Zellen wurde der NucleoCounter[®] NC-200[™] (ChemoMetec A/S, Allerød, Dänemark) verwendet. Dabei wurde je eine Probe des Ausgangs-Buffy Coats und der gefilterten Zellen gemessen. Zur Vitalitätsbestimmung der Leukozyten musste vor der jeweiligen Analyse eine Elimination der Erythrozyten durchgeführt werden. Dafür wurde zunächst die Lysing-Solution eines PhagoTest[®]-Testkits (Celonic Group, Heidelberg, Deutschland) im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. 100 μ l der Blutprobe wurde mit 400 μ l der verdünnten Lyse-

Lösung versetzt. Aufgrund der geringeren osmotischen Resistenz führte dies zur Lyse der Erythrozyten. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Probe bei 300xg und Raumtemperatur für fünf min zentrifugiert und pelletiert. Das entstandene Pellet wurde in 200µl 0,9% NaCl resuspendiert. Dann erfolgte die Aufnahme der Probe in spezielle Zählkassetten. In diesen befanden sich zwei Färbemittel: die immobilisierten Fluorophore Acridinorange (AO, orange) und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, blau) (90). AO ist membrangängig und färbt alle Zellen. DAPI ist geringfügig membranimpermeabel und färbt nur nicht-lebende Zellen (91). Beide Farbstoffe konnten über das Fluoreszenzmikroskop im Gerät detektiert werden (92). Anhand der AO-Fluoreszenz wurde die Gesamtzellzahl ermittelt; anhand der DAPI-Fluoreszenz die Anzahl der toten Zellen. Aus der Differenz der AO- und DAPI-Fluoreszenzmessung konnte die Vitalität der Leukozyten in der Probe bestimmt werden. Dies erfolgte automatisch mit der zugehörigen Software NC-View™ (93).

3.3.3 Mikroskopische Differenzierung und Bewertung

Um den Einfluss der Filter, des Trypsins und der Accutase auf die Morphologie der Zellen beurteilen zu können, wurden Blutausstriche angefertigt. Dabei wurde je ein Blutausstrich des zu filternden Buffy Coats sowie der herausgespülten Zellen des jeweiligen Versuchs angefertigt und anschließend verglichen. In den meisten Fällen war eine Zellaufkonzentration durch Zentrifugation notwendig. Daher wurden die Ansätze zwei Mal bei 300xg für fünf min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands konnte aus dem Pellet ein Blutausstrich angefertigt werden. Dieser wurde dann mittels Pappenheim-Färbung angefärbt. Dafür wurde das Schnellfärbe-Kit von Labor+Technik Eberhard Lehmann (Berlin, Deutschland) nach Herstelleranleitung verwendet. Es wurden 100 bis 200 Zellen pro Ausstrich ausgezählt. Die Beurteilung erfolgte unter dem Lichtmikroskop VisiScope TI385 (VWR, Radnor, USA) mit dem 100er-Objektiv sowie Immersionsöl nach folgenden Gesichtspunkten (Gesamtvergrößerung: 1000fach):

- Morphologie der Leukozyten
- Verhältnis der Anzahl der Granulozyten zu anderen Zellen der Leukozyten-Reihe
- Morphologie der Erythrozyten

Bei der mikroskopischen Betrachtung wurde vor allem die Veränderung der gewonnenen Zellen im Vergleich zum ungefilterten Buffy Coat bewertet. Als Zeichen für eine beginnende Zelldestruktion der Leukozyten wurden die zunehmende Granularität des Zellplasmas, die Verdichtung des Zellkerns, die Darstellung von einzelnen Zellfragmenten oder eine defekte

Zellmembran gewertet. Ein normaler inaktiver Lymphozyt ist dabei 6-8 μm groß, ein Granulozyt 10-12 μm und ein Monozyt 15-20 μm (12).

3.3.4 Messung der Phagozytose und des oxidativen Bursts mittels Durchflusszytometrie

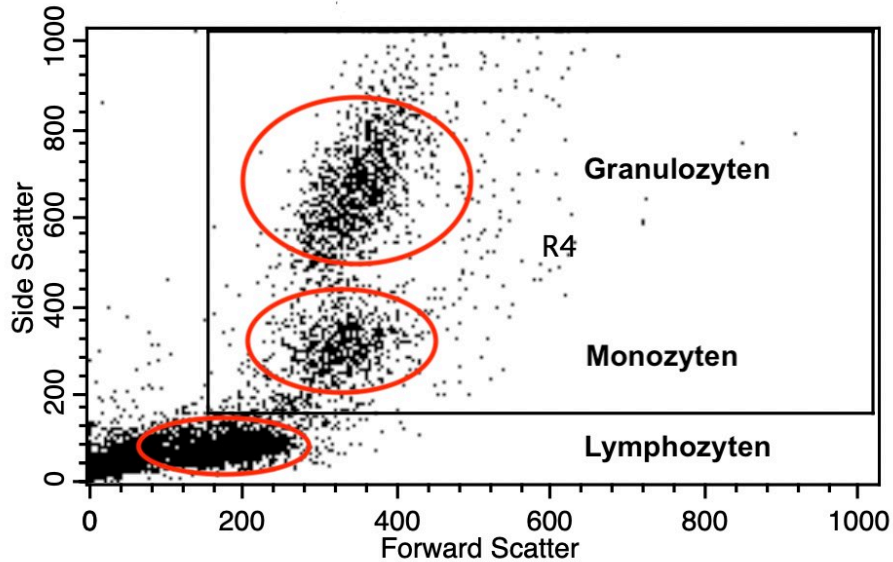


Abb. 9: Beispielhafte Einteilung der Leukozyten-Populationen in der Durchflusszytometrie nach Größe (Forward Scatter, x-Achse) und Granularität (Side Scatter, y-Achse) im Streulicht-Dot-Plot, zusätzlich Gate „R4“ zur Auswahl der phagozytierenden Zellen.

Für die Durchführung der Durchflusszytometrie wurde das Gerät FACSCalibur mit der Software CellQuestTM Pro von der Firma BD Biosciences (San Jose, USA) und das Gerät MACSQuant 16 der Firma Miltenyi Biotec GmbH (Gladbach, Deutschland) verwendet.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Veränderung von Laserlicht, welches auf Zellen gerichtet wird. Dabei wird zum einen die Ablenkung des Lichts und zum anderen die Lichtintensität bei bestimmten Wellenlängen detektiert. Jede dieser Änderungen des Laserlichts wird als Event definiert. Da das Gerät nicht zwischen intakten Zellen, Verunreinigungen oder zerstörten Zellen unterscheiden kann, erfolgt eine Differenzierung durch die charakteristische Lichtstreuung anhand der Größe (FSC, forward-scatter) und der Granularität (SSC, side-scatter) der Events (94,95). Aufgrund dieser Eigenschaften erstellt das Gerät ein Punktdiagramm (Dot-Plot), in dem die Events nach ihrer Größe und ihrer Granularität aufgetragen werden. Im Dot-Plot von menschlichem peripherem Blut (Abb. 9) kann die Einteilung der Leukozyten in ihre Subpopulationen dargestellt werden. Da Lymphozyten eher klein sind und keine Granula enthalten, befinden sich diese nahe des Diagramm-Ursprungs. Bei Granulozyten und Monozyten nimmt die Größe und die Granularität zu, sodass diese oberhalb der Lymphozyten eingeordnet werden (Abb. 9, rote Kreise). Mit Hilfe eines sogenannten Gates können Zellen

aus einem Durchflusszytometrie-Experiment, die genauer analysiert werden sollen, spezifisch ausgewählt werden. Das Gating auf Monozyten und Granulozyten (Abb. 9, Gate R4) ermöglicht die gezielte sequenzielle Identifizierung der Zellpopulationen, die für die Phagozytose von Interesse sind.

3.3.4.1 Ermittlung der Fähigkeit zur Phagozytose

Ziel dieser Analyse war es, den prozentualen Anteil der phagozytierenden Leukozyten an der Gesamtzahl der vorhandenen Leukozyten zu bestimmen. Zur Bestimmung der Phagozytose-Fähigkeit wurde das Testkit PhagoTest® der Firma Celonic Deutschland GmbH & Co. KG verwendet. Zielobjekt der Phagozytose sind dabei Komplement- und Immunglobulin-opsonierte FITC-markierte tote *Escherichia coli* (*E. coli*)-Bakterien. Dabei wurde je ein negativer (keine Phagozytoseaktivität) und ein positiver Ansatz (Phagozytoseaktivität) des Buffy Coats und der herausgespülten Leukozyten aus einem Filter verwendet. In jedem Ansatz wurden 5×10^5 Leukozyten benötigt.

Die Phagozytose ist ein calciumabhängiger Prozess (96). Bei der Herstellung wurden die Buffy Coats mit Citrat antikoaguliert, welches Calcium bindet. Daher war es notwendig, die Proben je nach Zellzahl mit einer Calcium-Heparin-Lösung zu verdünnen, bis die Zielzellzahl von 5×10^5 Leukozyten erreicht war.

Pro Ansatz wurden 100µl der verdünnten Proben verwendet. Initial erfolgte eine Kühlung der Proben für mindestens zehn min auf Eis, um Phagozytose-Prozesse zu unterbinden. Der Negativ-Ansatz wurde mit je 20µl Waschlösung gewaschen, der Positiv-Ansatz mit 20µl FITC (Fluoresceinisothiocyanat-Fluoreszenzfarbstoff) -markierten *E. coli*-Bakterien versetzt. Anschließend wurden alle Ansätze für zehn min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde die Phagozytose auf Eis gestoppt. Der nächste Schritt umfasste das Versetzen mit je 100µl Quenching-Lösung, welche die Unterscheidung von Bakterien, die in die Zellen aufgenommen wurden, und Bakterien außerhalb von Zellkörpern ermöglicht (97). Anschließend erfolgte das zweimalige Waschen mit drei ml Waschlösung. Danach wurden die Proben bei 250xg und 4°C für fünf min zentrifugiert und pelletiert. Als nächstes wurden die Erythrozyten bei Raumtemperatur lysiert: Die Proben des Buffy Coats wurden für 20min mit zwei ml Lyse-Reagenz versetzt, ebenso beim Terumo-Filter. Bei dem Filter DONOPack von Lmb Technologie wurden die Positiv-Ansätze nur für zehn min lysiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation (wie oben beschrieben) mit anschließendem Pelletieren und ein erneutes Waschen der Proben. Im letzten Schritt wurden alle Proben mit 200µl DNA-Lösung versetzt und im Dunkeln auf Eis für zehn min inkubiert (97). Danach erfolgte die Messung der

Proben mit dem Durchflusszytometer. Bei der Detektion der Fluoreszenz wurden nur solche Zellen gemessen, deren DNA-Gehalt mindestens der einer humanen Zelle entspricht, sodass Artefakte wie Bakterienaggregate oder Zellfragmente ausgeschlossen wurden (98). Der DNA-FL2-Kanal ordnete die gemessenen Events aus dem Gate R4 (Abb. 9) nach dem DNA-Gehalt der Zellen, um eine weitere Differenzierung zwischen Leukozyten, Aggregaten von Bakterien und toten Zellen zu ermöglichen. Dieser Kanal sollte einen deutlichen Peak bei 10^2 haben.

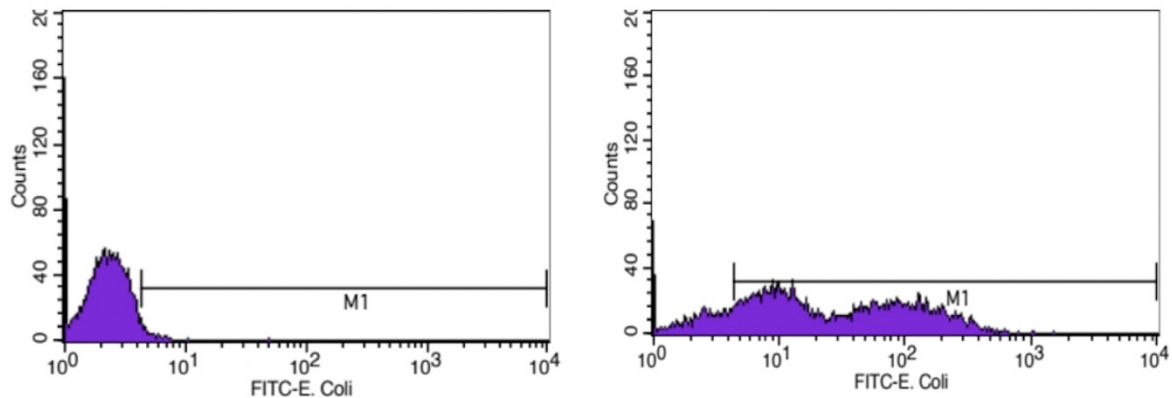


Abb. 10: Exemplarische Darstellung einer Messung der Phagozytose-Fähigkeit mittels FACSCalibur. In beiden Diagrammen sind die FITC-markierten *E. coli*-Bakterien (x-Achse) zur Anzahl der Events (y-Achse) aufgetragen. In der Negativ-Kontrolle (links) wird durch einen Marker (M1) die Eigenfluoreszenz festgelegt. M1 kann dann auf die Positiv-Kontrolle (rechts) übertragen werden. Auf diese Weise kann die Phagozytose-Fähigkeit in dieser Probe ermittelt werden.

Der FL1-Kanal (FITC) identifizierte FITC-negative und -positive Zellen, bei denen eine Phagozytose stattgefunden hat. Die Negativ-Kontrolle wurde dabei der Positiv-Kontrolle gegenübergestellt und mittels eines Markers (M1) deren Differenz ermittelt. Dies wird in Abb. 10 dargestellt.

Bei der Analyse am MACSQuant wurde die Overlay-Methode genutzt. Dabei wurde die Fluoreszenz der Negativ- und Positiv-Kontrolle in einem Histogramm übereinander gelegt. Diese Methode ist in Abb. 11 dargestellt. Die violette Kurve zeigt die FITC-Signale der Positiv-Kontrolle, die graue Kurve die der Negativ-Kontrolle. Die Schnittstelle, welche mit dem Marker (blaue Linie) bestimmt wird, gibt die Phagozytose-Rate an.

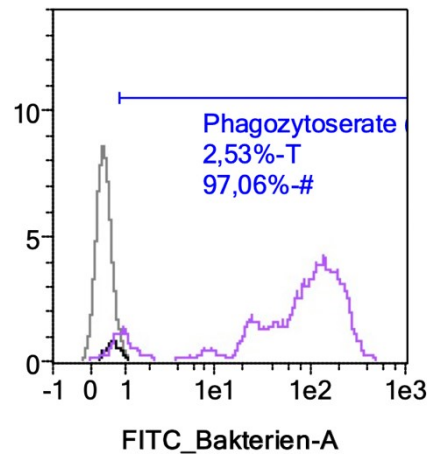


Abb. 11: Exemplarische Darstellung der Overlay-Methode zur Bestimmung der Phagozytose-Rate am MACSQuant. Aufgetragen werden die Fluoreszenzsignale (x-Achse) zur Anzahl der Events (y-Achse). Die violette Kurve zeigt die FITC-Signale der Positiv-Kontrolle, die graue Kurve die der Negativ-Kontrolle. Die Schnittstelle, welche mit dem Marker (blaue Linie) bestimmt wird, gibt die Phagozytose-Rate an.

3.3.4.2 Ermittlung der Fähigkeit zum oxidativen Burst

Zur Bestimmung der Fähigkeit zum oxidativen Burst wurde das Testkit PhagoBurst® der Firma Celonic Deutschland GmbH & Co. KG verwendet. Hier wurden je ein positiver und ein negativer Ansatz mit einer Zellzahl von 5×10^5 bei 100 μ l Gesamtvolumen je Ansatz verwendet. Nachdem die Proben für zehn min auf Eis gekühlt wurden, wurden diese mit Waschlösung beim negativen Ansatz und mit *E. coli* beim positiven Ansatz versetzt und für zehn min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Danach wurde je Ansatz 20 μ l Substratlösung, welche Rhodamin enthielt, hinzugefügt und im Wasserbad bei 37°C für zehn min inkubiert. Danach erfolgte die Lyse der Erythrozyten bei Raumtemperatur: Die Proben des Buffy Coats wurden für 20min mit zwei ml Lyse-Lösung lysiert, ebenso beim Terumo-Filter. Bei dem Filter DONOpack von Lmb Technologie wurden die Positiv-Ansätze nur für zehn min lysiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 4°C und 250xg und das Waschen der Proben. Nachdem die Proben mit 200 μ l DNA-Lösung versetzt und im Dunkeln auf Eis inkubiert wurden, erfolgte die Messung mit dem Durchflusszytometer auch hier im Vergleich Negativ- zu Positiv-Ansatz (99). Diese Auswertung am FACSCalibur wird in Abb. 12 dargestellt. Es wurde die Eigenfluoreszenz mittels eines Markers (M1) bestimmt. Diese wurde der Fluoreszenz der Monozyten und Granulozyten, die zum oxidativen Burst fähig waren, gegenübergestellt.

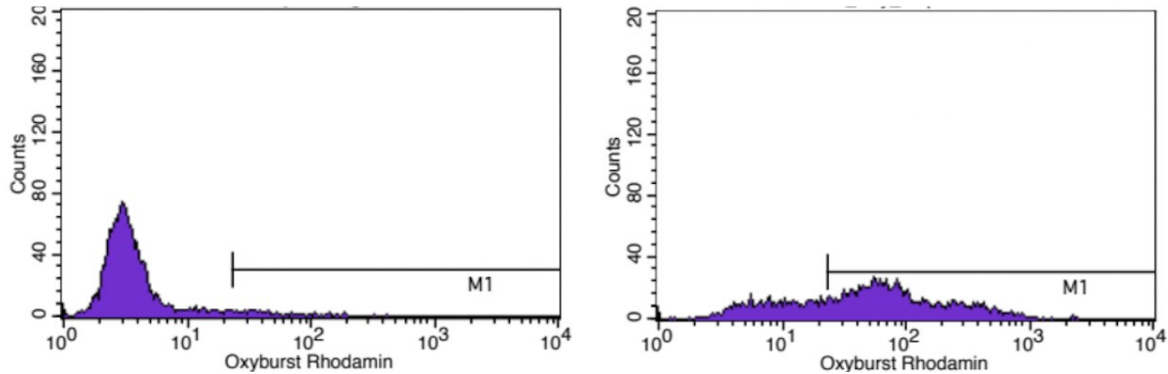


Abb. 12: Exemplarische Darstellung einer Messung der Fähigkeit zum oxidativen Burst mittels FACSCalibur. In beiden Diagrammen sind die Fluoreszenzsignale (x-Achse) zur Anzahl der Events (y-Achse) aufgetragen. In der Negativ-Kontrolle (links) wird durch einen Marker (M1) die Eigenfluoreszenz festgelegt. M1 kann dann auf die Positiv-Kontrolle (rechts) übertragen werden. Auf diese Weise kann die Fähigkeit zum oxidativen Burst in dieser Probe ermittelt werden.

Bei der Analyse am MACSQuant wurde die Overlay-Methode genutzt. Diese wird exemplarisch in Abb. 13 dargestellt. Die Fluoreszenzen der Negativ- und der Positivkontrolle wurden in einem Histogramm dargestellt. Die Positiv-Kontrolle (rote Kurve) und die Negativ-Kontrolle (orange Kurve) wurden dabei übereinander gelegt. Der Schnittpunkt zeigt die Oxyburst-Rate an, die mit einem Marker (blaue Linie) bestimmt werden kann.

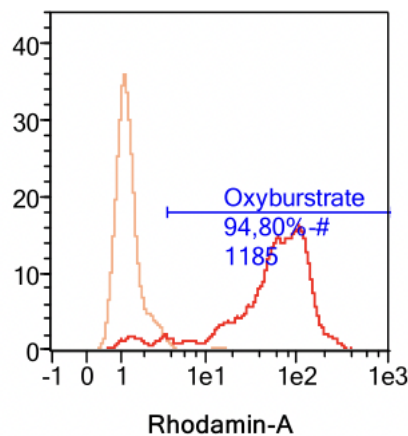


Abb. 13: Exemplarische Darstellung der Overlay-Methode zur Bestimmung der Oxyburst-Rate am MACSQuant. Aufgetragen werden die Fluoreszenzsignale (x-Achse) zur Anzahl der Events (y-Achse). Die rote Kurve zeigt die Signale der Positiv-Kontrolle, die orange Kurve die der Negativ-Kontrolle. Die Schnittstelle, welche mit dem Marker (blaue Linie) bestimmt wird, gibt die Oxyburst-Rate an.

3.4 Statistische Methoden

Zur deskriptiven Statistik wurden der Median und der Interquartilsabstand berechnet. Eine Normalverteilung konnte nicht angenommen werden, daher wurden nicht-parametrische Tests verwendet. Zum Vergleich verschiedener Methoden zur Rückgewinnung wurde der Mann-Whitney-U-Test und der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test genutzt. Eine statistische Signifikanz

wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Zur Berechnung wurden Excel Version 16.46 sowie Jamovi Version 1.6.23 verwendet. Auf Korrekturen für multiples Testen wurde verzichtet, da es sich in dieser Arbeit um explorative Analysen handelt.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung eines typischen Buffy Coats

Ausgangspunkt für die Untersuchungen der Filter waren Buffy Coats. Der Median des Buffy Coat-Volumens war 75ml. Tab. 1 zeigt die Mediane der Zusammensetzung von zwölf Buffy Coats. Es waren $1,53 \times 10^9$ Leukozyten vorhanden. Weiterhin waren außerdem $0,34 \times 10^{12}$ Erythrozyten sowie $100,62 \times 10^9$ Thrombozyten enthalten. Wie Tab. 1 abbildet, waren Granulozyten mit 50,7% die häufigste Population. Der Anteil der Lymphozyten lag bei 39,4%. Monozyten bildeten den geringsten Anteil mit 12,7%.

Tab. 1: Darstellung der Zusammensetzung der ungefilterten Buffy Coats: Es sind die Anzahl der Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten in absoluter Zellzahl sowie die Leukozytenpopulationen in prozentualen Angaben abgebildet, gemessen am Hämatologie-Analysator Sysmex KX-21N. Es ist der Median (Interquartilsabstand) aus zwölf Buffy Coats dargestellt.

Zelllinie	Anzahl	Leukozyten-Population	Anteil [%]
Erythrozyten [$\times 10^{12}$]	0,34 (0,06)	Lymphozyten	39,4 (16,9)
Leukozyten [$\times 10^9$]	1,53 (0,68)	Granulozyten	50,7 (31,4)
Thrombozyten [$\times 10^9$]	100,62 (35,1)	Monozyten	12,7 (5,6)

Da die Fähigkeiten zur Phagozytose und zum oxidativen Burst große individuelle Schwankungen aufwiesen, wurden diese aus 21 Messungen von ungefilterten Buffy Coats gemittelt. Diese sind in Tab. 2 dargestellt. Der Median der Phagozytose-Rate wurde mit 87,4% bestimmt, der Median der Oxyburst-Rate mit 71,5%. Die Analyse am NucleoCounter® ergab einen Median der Leukozytenvitalität von 95,4%.

Ergebnisse

Tab. 2: Darstellung der Funktionalität (Phagozytose, oxidativer Burst) und Vitalität von Leukozyten aus Buffy Coats.

Die Funktionalität wurde mittels Durchflusszytometrie, die Vitalität mittels NucleoCounter® NC-200™ bestimmt. Dargestellt ist der Median (Interquartilsabstand), gemessen wurden 21 Buffy Coats.

Parameter	Wert [%]
Phagozytose-Fähigkeit	87,4 (30,5)
Fähigkeit zum oxidativen Burst	71,5 (40,0)
Vitalität	95,4 (2,4)

Abb. 14 zeigt exemplarisch einen Blutausstrich eines Buffy Coats. Dieser wurde mit der Pappenheim-Methode gefärbt. Abgebildet sind normal geformte, etwas vergrößerte, dicht gelagerte Erythrozyten sowie zahlreiche Thrombozyten. Weiterhin sind ein normomorpher Lymphozyt (vertikaler Pfeil) sowie mehrere normomorphe Granulozyten (Kreis) zu erkennen. In der Mitte befindet sich eine Zelle, welche bereits morphologische Abweichungen aufweist: Der Leukozyt beginnt sich zu verformen (horizontaler Pfeil), was an der Größenzunahme und den undeutlichen Zellgrenzen erkennbar ist. Im Zytoplasma finden sich kleine Vakuolen. In der rechten oberen Ecke zeigt sich ein angeschnittener normomorpher Monozyt. In der mikroskopischen Auswertung wurden Blutausstriche von 36 Buffy Coats betrachtet. Pro Buffy Coat wurden 100 Zellen ausgezählt. Für jede Population wurde der Median berechnet. Von 100 Zellen konnten 42 Lymphozyten gezählt werden. Die Granulozytenzahl betrug 40, die Monozytenzahl elf.

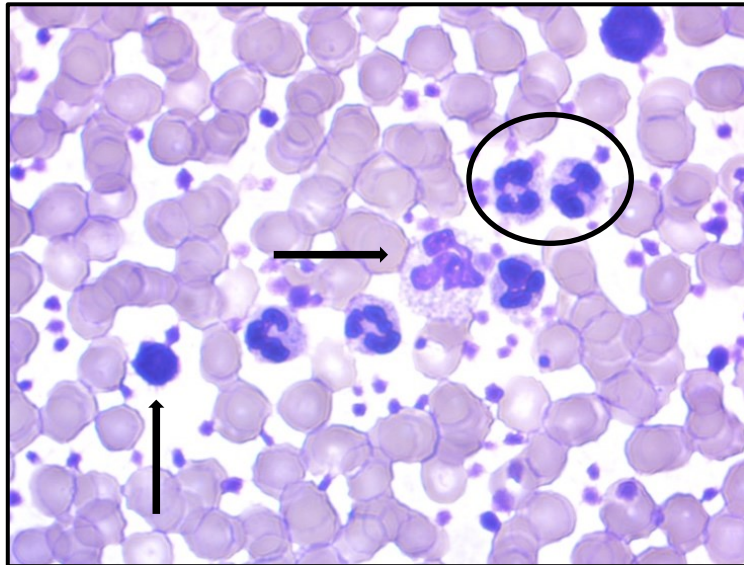


Abb. 14: Beispiel eines Blutausstrichs eines Buffy Coats (1000fache Vergrößerung, Färbung nach Pappenheim). Dargestellt sind Erythrozyten, Thrombozyten sowie normomorphe Granulozyten (Kreis, Größe 10-16 μm), Lymphozyten (vertikaler Pfeil, Größe 6-8 μm) und ein Monozyt (obere rechte Ecke, Größe 15-20 μm). Eine Zelle kann nicht mehr sicher ihrer Ursprungspopulation zugeordnet werden (horizontaler Pfeil). Größenangaben entnommen aus (12).

Es kam häufig vor, dass sich die Granulozyten in Nestern am Rand des Ausstrichs akkumulierten. Dieses Phänomen ist in Abb. 15 dargestellt. Neben den Zellnestern aus Granulozyten (vertikaler Pfeil) sind weiterhin mehrere Monozyten (horizontaler Pfeil) erkennbar.

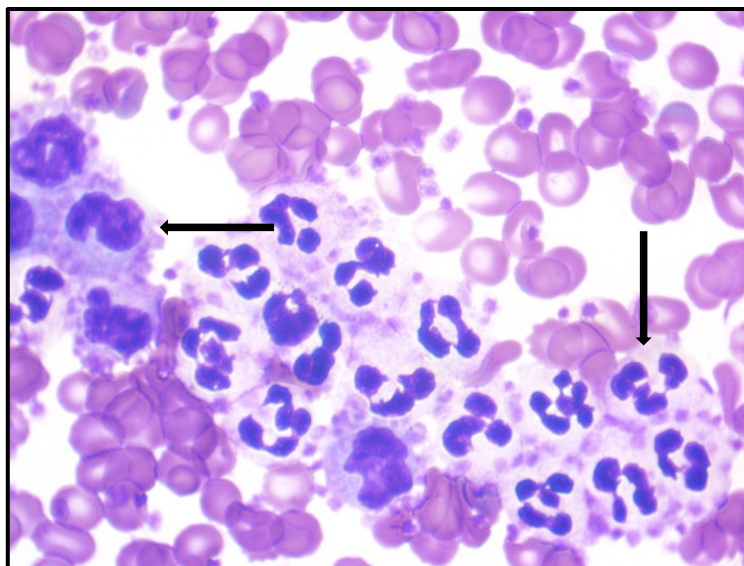


Abb. 15: Beispiel eines Granulozyten-Nests mit einigen Monozyten am Rand eines Buffy Coat-Ausstrichs (1000fache Vergrößerung, Färbung nach Pappenheim). Dargestellt sind Granulozyten (vertikaler Pfeil) und Monozyten (horizontaler Pfeil), die sich häufig am Rand eines Buffy Coat-Ausstrichs in Nestern formierten.

4.2 Leukozytenrückgewinnung nach Filtration – DONOpack von Lmb Technologie

4.2.1 Filtrationsdauer, Filtrationsausbeute und Spülung in beide Flussrichtungen

Zur Beurteilung des DONOpack-Filters wurden drei Filter unter gleichen Bedingungen untersucht. Durch den Filtrationsprozess entstanden im Median 33ml Filtrat. Dabei blieben 42ml im Filter zurück. Bis zur vollständigen Entleerung des Buffy Coats vergingen im Median 157sec. In den Filtraten waren keine Leukozyten nachweisbar, sodass man von einer vollständigen Leukozytendepletion ausgehen kann. In Tab. 3 ist die Leukozytenausbeute bei verschiedenen Spülschritten in und entgegen der Flussrichtung dargestellt.

Tab. 3: Darstellung der Leukozytenausbeute bei Spülung von DONOpack-Filtern (Lmb Technologie) mit 4 x 50ml 0,9% NaCl in und entgegen der Flussrichtung. Es ist der Median (Interquartilsabstand) dargestellt, $n_{\text{Filter}} = 3$.

	1. Schritt	2. Schritt	3. Schritt	4. Schritt	Gesamtausbeute
Spülschritt [ml]	50	50	50	50	200
Leukozytenkonzentration bei Spülung in Flussrichtung [10 ⁹ /l]	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Gesamtausbeute bei Spülung in Flussrichtung [10 ⁸]	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Leukozytenkonzentration bei Spülung entgegen der Flussrichtung [10 ⁹ /l]	1,5 (0,6)	0,9 (0,6)	1,1 (0,6)	0,7 (0,3)	4,2 (1,8)
Gesamtausbeute bei Spülung entgegen der Flussrichtung [10 ⁸]	0,63 (0,24)	0,45 (0,32)	0,51 (0,30)	0,33 (0,14)	1,93 (0,85)

In der 1. und 2. Zeile wird der jeweilige Spülschritt mit dem genutzten Spülvolumen dargestellt. Tab. 3 zeigt, dass insgesamt $1,93 \times 10^8$ der gefilterten Leukozyten nach vier Spülungen entgegen der Flussrichtung wieder herausgespült werden konnten (6. Zeile). Dies entspricht 11,9% der

gefilterten Leukozyten. Bei der Spülung in Flussrichtung konnten dagegen keine Leukozyten im Filtrat detektiert werden (3. und 4. Zeile). Dabei fällt auf, dass die Leukozytenkonzentration bei Spülung entgegen der Flussrichtung (5. Zeile) mit zunehmendem Spülvolumen abnahm: Im 1. Spülschritt lag die Konzentration bei $1,5 \times 10^9/l$. Im letzten Spülschritt lag sie bei $0,7 \times 10^9/l$. In Tab. 4 wird die Veränderung der Phagozytose- und Oxyburst-Fähigkeit der Leukozyten durch die Filtration dargestellt. Es wurden drei Buffy Coats untersucht, die über jeweils einen Filter gegeben wurden. Im Ausgangs-Buffy Coat lag vor der Filtration die Phagozytose-Rate bei 87,4% und die Oxyburst-Rate bei 71,5% (mittlere Spalte, vergleiche Kapitel 4.1). Nach der Filtration wurde eine Phagozytose-Rate von 92,2% und Oxyburst-Rate von 94,9% bestimmt (2. Spalte).

Tab. 4: Ergebnisse der Funktionsanalysen von Leukozyten des ungefilterten Buffy Coats und des Buffy Coats nach Filtration über einen DONOpack-Filter (Lmb Technologie) mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der Median (Interquartilsabstand), $n_{\text{Filter}} = 3$.

	Buffy Coat	Gefilterter Buffy Coat
Phagozytose-Fähigkeit [%]	87,4 (30,5)	92,2 (4,7)
Fähigkeit zum oxidativen Burst [%]	71,5 (40,0)	94,9 (5,4)

Die Vitalität der Leukozyten nach Filtration war leicht reduziert auf 91,3%.

Bei der mikroskopischen Betrachtung der Blutausstriche nach der Rückspülung der DONOpack-Filter konnte beobachtet werden, dass in den Rückspülungen anteilig mehr Granulozyten zu finden waren als im ungefilterten Buffy Coat (Abb. 16). Im Buffy Coat-Ausstrich waren Lymphozyten die dominierende Zellpopulation gewesen, nach der Spülung waren die Granulozyten dominierend. Außerdem nahmen die Anzeichen für Zelldestruktion sowie die Anzahl der Zellen, die nicht mehr sicher einer Population zugeordnet werden konnten, zu. Insbesondere die Verformung und Vakuolisierung der Zellen sowie Destruktion der Zellmembran konnten vermehrt beobachtet werden.

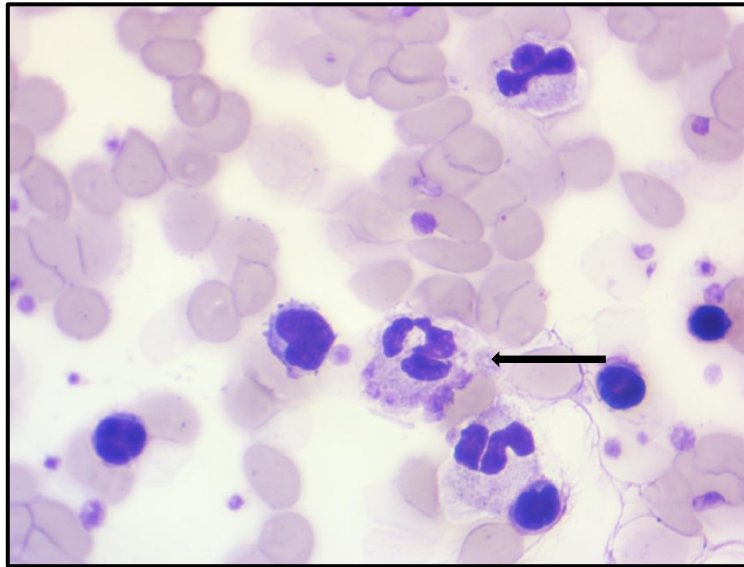


Abb. 16: Beispiel eines typischen Blutausstrichs bei Spülung eines DONOpack-Filters (Lmb Technologie) nach der Filtration (1000fache Vergrößerung, Färbung nach Pappenheim). Zu erkennen sind verformte Erythrozyten sowie zunehmend verformte Granulozyten (Pfeil). Außerdem sind Lymphozyten und ein Monozyt erkennbar.

4.2.2 Dissoziation mit Trypsin

Zunächst wurde die Zusammensetzung des Trypsins mit dem Blutgasanalysator ABL-90 Flex (Radiometer, Krefeld, Deutschland) untersucht. Der pH-Wert ist mit 6,9 bestimmt worden, die Kaliumkonzentration mit 5,4mmol/l und die Natriumkonzentration mit 142mmol/l. Das Trypsin war calciumfrei. Eine Interferenz mit der Citrat-Antikoagulation des Buffy Coats war folglich nicht zu erwarten.

Tab. 5 zeigt die Rückgewinnung von Leukozyten aus dem Filter nach der Inkubation mit Trypsin sowie die dazugehörigen Ergebnisse der Vitalitätsanalysen. Es wurden zwölf Filter (drei je Inkubationszeit) unter gleichen Bedingungen getestet. Dabei war bei der Spülung direkt nach der Trypsin-Inkubation die Inkubationszeit von 15min am effektivsten (Tab. 5, 2. Spalte). In diesem Fall konnten 12,0% der Leukozyten aus dem Filter gewonnen werden. Bei der Spülung nach einer Stunde nahm die Ausbeute mit der Inkubationszeit ab (4. Spalte): Bei 10-minütiger Inkubation war die Ausbeute mit 8,7% bestimmt worden, bei 25-minütiger Inkubation mit 5,4%. Am Folgetag (5. Spalte) war der Anteil der gewonnenen Leukozyten ähnlich wie am Vortag: Am geringsten war er mit 5,3% bei 10min und am höchsten mit 7,5% bei 20min. Insgesamt war die Inkubationszeit von 15min mit 26,3% am effektivsten (7. Spalte). Dort lag die absolute Zellzahl bei $2,08 \times 10^8$. Auch eine Inkubation von 10min mit 26,1% und von 25min mit 24,2% waren vergleichbar effektiv. Die Steigerung der Ausbeute durch diese Methode ist im Vergleich zur einfachen Rückspülung statistisch signifikant ($p < 0,05$). Dabei wurde die gesamte relative Leukozytenausbeute durch die Inkubation mit Trypsin mittels Mann-Whitney-U-Test mit der einfachen Rückspülung verglichen.

Tab. 5: Darstellung der Leukozytenausbeute zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei Inkubation von DONOpack-Filtern (Lmb Technologie) mit Trypsin mit steigender Inkubationszeit. Zusätzlich ist die Vitalitätsanalyse der jeweils gewonnen Leukozyten nach initialer Spülung und am Folgetag aufgeführt. Dargestellt ist der Median (Interquartilsabstand) der herausgelösten Anteile bezogen auf die gefilterten Leukozyten, $n_{\text{Filter}} = 3$ je Inkubationszeit.

Inkubationszeit [min]	Herausgelös. Leukozyten initiale Spülung [%]	Vitalität initiale Spülung [%]	Herausgelöste Leukozyten nach 1h [%]	Herausgelöste Leukozyten 2. Tag [%]	Vitalität 2. Tag [%]	Gesamt- ausbeute [%]
10	8,2 (9,2)	80,8 (13,5)	8,7 (6,2)	5,3 (5,1)	69,5 (38,3)	26,1 (16,7)
15	12,0 (15,2)	78,0 (0,4)	6,7 (3,1)	7,4 (1,4)	66,1 (58,7)	26,3 (17,1)
20	3,5 (13,6)	75,0 (26,1)	5,6 (7,1)	7,5 (6,7)	58,0 (26,7)	21,2 (23,0)
25	7,7 (10,8)	69,8 (26,7)	5,4 (3,1)	6,9 (3,1)	69,8 (32,2)	24,2 (17,5)

Es wurde zudem der Verlauf der Vitalität der Leukozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Die Analyse wurde mit den initial gewonnen Leukozyten durchgeführt (Tab. 5, 3. Spalte). Es konnte gezeigt werden, dass durch Filtration und Inkubation mit Trypsin die Vitalität der gefilterten Leukozyten im Vergleich zu den Leukozyten des ungefilterten Buffy Coats (Tab. 2) um mehr als 14% gesunken war: Nach 10-minütiger Inkubation nahm die Vitalität auf 80,8% ab. Bei 15min nahm diese auf 78,0% ab, bei 20min auf 75,0%. Nach 25min wurde eine Vitalität von 69,8% ermittelt. Die Vitalitätsabnahme war also direkt proportional zur Inkubationszeit. Außerdem zeigt die Tab. 5, dass bei der Trypsin-Inkubation für 10min, 15min und 20min die Vitalität im Zeitraum von der initialen Spülung bis zum Folgetag nochmals um mindestens 10% abnahm (6. Spalte). Bei 10-minütiger Inkubation sank diese auf 69,5% ab, bei 15min auf 66,1% und bei 20min auf 58,0%. Die Vitalität nahm bei 25-minütiger Inkubation nicht weiter ab.

Die Ausbeute durch die Inkubation mit Trypsin wird im folgenden Diagramm (Abb. 17) nochmals veranschaulicht. Die Mediane (Striche im Boxplot) liegen bei 10-, 15- und 25-minütiger Inkubation (blauer, oranger, gelber Boxplot) vergleichbar hoch. Außerdem zeigt das Diagramm die Steigerung der Leukozytenausbeute durch die Inkubation mit Trypsin im Vergleich zur einfachen Rückspülung (grün).

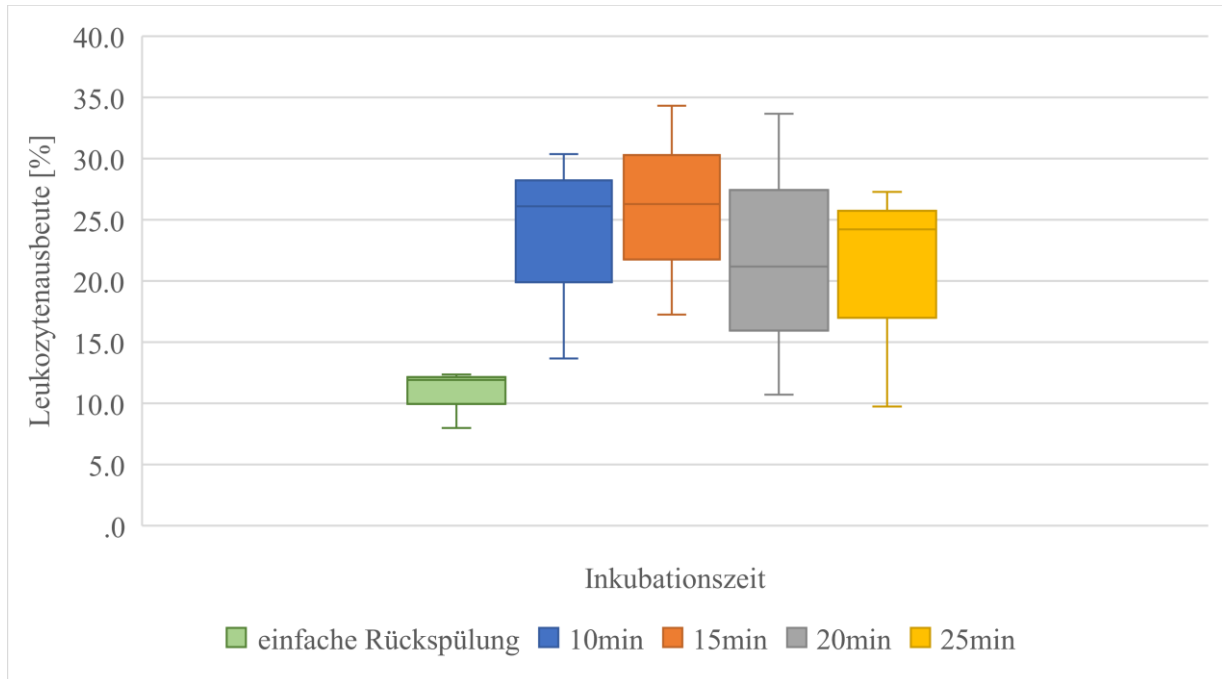


Abb. 17: Grafische Darstellung der Leukozytenausbeute (y-Achse in [%]) aus DONOpack-Filtern (Lmb Technologie) zu unterschiedlichen Inkubationszeiten mit Trypsin sowie aus einfacher Rückspülung (x-Achse). Dargestellt als Boxplots mit Median (Strich) mit minimalen und maximalen Ausreißern, 1. und 3. Quartil (Boxplot-Begrenzung), $n_{\text{Filter}} = 3$ je Inkubationszeit.

Bei der mikroskopischen Bewertung der Blutausrichthe wurde der Buffy Coat mit den Spülungen nach der Trypsin-Inkubation sowie mit den Spülungen nach einer Stunde und am Folgetag verglichen. Dies wird beispielhaft in Abb. 18 dargestellt. Es konnte beobachtet werden, dass mit zunehmender Inkubationszeit die Anzeichen für einen Zelluntergang zunahmen. Insbesondere die Auflösung der Zellmembran sowie eine zunehmende Vakuolisierung der Zellen konnte beobachtet werden (Abb. 18, A). Außerdem veränderten sich bei der initialen Spülung nach dem Trypsinieren die Anteile der Leukozytenpopulationen, die aus dem Filter gewonnen werden konnten. Es kam durch die initialen Spülungen zu einem deutlichen Anstieg des Granulozyten-Anteils im Vergleich zum Buffy Coat. In der Spülung nach einer Stunde stieg der Anteil der Lymphozyten dann wieder. Ansonsten konnte kein wesentlicher Unterschied hinsichtlich der Morphologie zwischen den beiden Spülschritten beobachtet werden (Abb. 18, A und B).

Bei Spülung des Filters am Folgetag zeigte sich im Gegensatz dazu eine große Zunahme an destruierten Zellen. Die Zellen waren zum Teil nicht mehr ihrer Populationen zuzuordnen (Abb. 18, C).

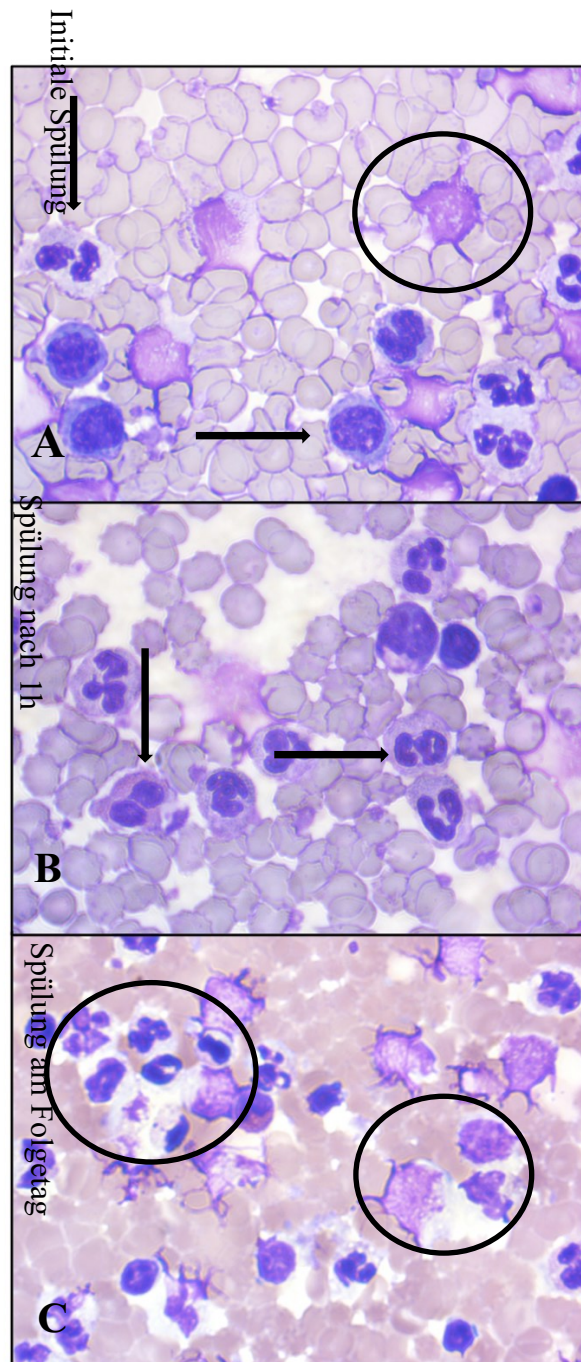


Abb. 18: Beispiel eines typischen Blutausstrichs bei Spülung eines DONOpack-Filters (Lmb Technologie) nach Inkubation mit Trypsin (1000fache Vergrößerung, Färbung nach Pappenheim). **A:** Spülung unmittelbar nach der Inkubation mit Trypsin. Zu erkennen sind einige normal geformte Zellen (horizontaler Pfeil). Einige Zellen zeigen morphologische Veränderungen wie Verformung und Vakuolisierung (vertikaler Pfeil). Außerdem sind nicht mehr identifizierbare Zellen zu finden (Kreis). **B:** Spülung nach 1h. Ähnliches Bild wie A. **C:** Spülung am Folgetag. Zu erkennen sind dichte Zellen, viele bereits geschädigte oder vollständig destruierte Zellen, welche nicht mehr sicher ihrer ursprünglichen Population zugeordnet werden können (Kreise).

Im darauffolgenden Versuch wurde der Einfluss der Filtration und der Inkubation mit Trypsin auf die Fähigkeit der gewonnenen Leukozyten zur Phagozytose sowie zum oxidativen Burst untersucht. Aufgrund der Ergebnisse der vorherigen Versuchsreihe wurde eine Inkubationszeit von 15min ausgewählt. Da für den darauffolgenden Versuch außerdem nur 100ml Spülung geplant waren, sprach ebenfalls die höhere Ausbeute nach zwei Spülschritten für diese Inkubationszeit.

Tab. 6: Ergebnisse der Funktionsanalysen von Leukozyten des ungefilterten Buffy Coats und des Buffy Coats nach Trypsin-Inkubation von DONOPack-Filtern (Lmb Technologie) für 15min mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der Median (Interquartilsabstand), $n_{\text{Filter}} = 3$.

	Buffy Coat	Gefilterter Buffy Coat
Phagozytose-Fähigkeit [%]	87,4 (30,5)	5,8 (4,8)
Fähigkeit zum oxidativen Burst [%]	71,5 (40,0)	5,3 (5,0)

In der Funktionsanalyse konnte ermittelt werden, dass durch die Trypsin-Inkubation die Fähigkeiten zur Phagozytose und zum oxidativen Burst abnahmen. Dies ist in Tab. 6 dargestellt. Im Vergleich zum Ausgangs-Buffy Coat, der eine Phagozytose-Fähigkeit von 87,4% aufwies, reduzierte sich diese durch die Anwendung von Trypsin um mehr als 81% auf 5,8%. Die Fähigkeit zum oxidativen Burst wurde von 71,5% um 66% auf 5,3% reduziert.

4.2.3 Dissoziation mit Accutase

Zu Beginn wurde die verwendete Accutase am Blutgasanalysator ABL-90 Flex gemessen. Im Vergleich zu Trypsin ist der Kaliumspiegel etwas niedriger und lag bei 3,9-4,0 mmol/l. Die Natrium-Konzentration war 150 mmol/l. Der pH-Wert lag mit 7,1 etwas höher als der pH-Wert von Trypsin mit 6,9. Accutase war ebenfalls calciumfrei. Eine Interferenz mit der Citrat-Antikoagulation des Buffy Coats war folglich nicht zu erwarten.

Tab. 7 zeigt die Leukozytenausbeute bei Rückgewinnung aus dem Filter nach der Inkubation mit Accutase. Es wurden zwölf Filter (drei Filter je Inkubationszeit) getestet. Die initiale Spülung direkt nach der Inkubation von 15min zeigte die größte Leukozytenausbeute mit 27,5% (2. Spalte). Bei der Spülung nach einer Stunde lag die höchste Ausbeute mit 10,2% bei 20-minütiger Inkubation (Tab. 7, 4. Spalte). Auf die Spülung am Folgetag wurde verzichtet. Insgesamt ist die Inkubationszeit von 15min am effektivsten. Die dort gewonnenen 42,0% entsprechen einer absoluten Zellzahl von $2,78 \times 10^8$. Die Vitalität wurde direkt nach der

Accutase-Inkubation bestimmt und wird ebenfalls in Tab. 7 gezeigt (3. Spalte). Die Steigerung der Ausbeute durch die Inkubation mit Accutase ist im Vergleich zur einfachen Rückspülung statistisch signifikant ($p < 0,05$). Dabei wurde die gesamte relative Leukozytenausbeute durch die Inkubation mit Accutase im Mann-Whitney-U-Test mit der einfachen Rückspülung verglichen.

Betrachtet man die Ergebnisse in der Tab. 7, so nahm die Vitalität der Leukozyten durch die Inkubation mit Accutase bis zu 20min nicht ab. Die Vitalität wurde zwischen 93,3% und 95,5% bestimmt. Bei einer Inkubationszeit von 25min konnte diese mit 88,6% bestimmt werden.

Tab. 7: Darstellung der Leukozytenausbeute zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei Inkubation von DONOpack-Filtern (Lmb Technologie) mit Accutase mit steigender Inkubationszeit. Zusätzlich ist die Vitalitätsanalyse der jeweils gewonnen Leukozyten nach initialer Spülung aufgeführt. Dargestellt ist der Median (Interquartilsabstand) der herausgelösten Anteile bezogen auf die gefilterten Leukozyten, $n_{\text{Filter}} = 3$ je Inkubationszeit.

Inkubationszeit [min]	herausgelöste Leukozyten initiale Spülung [%]	Vitalität initiale Spülung [%]	herausgelöste Leukozyten nach 1h [%]	Gesamt- ausbeute [%]
10	21,0 (19,9)	94,4 (20,4)	9,9 (7,3)	35,5 (22,6)
15	27,5 (26,6)	93,3 (18,2)	9,4 (9,0)	42,0 (30,4)
20	22,1 (6,0)	95,5 (11,8)	10,2 (12,8)	32,3 (18,8)
25	25,7 (26,1)	88,6 (11,9)	9,6 (2,5)	29,9 (30,0)

Ergebnisse

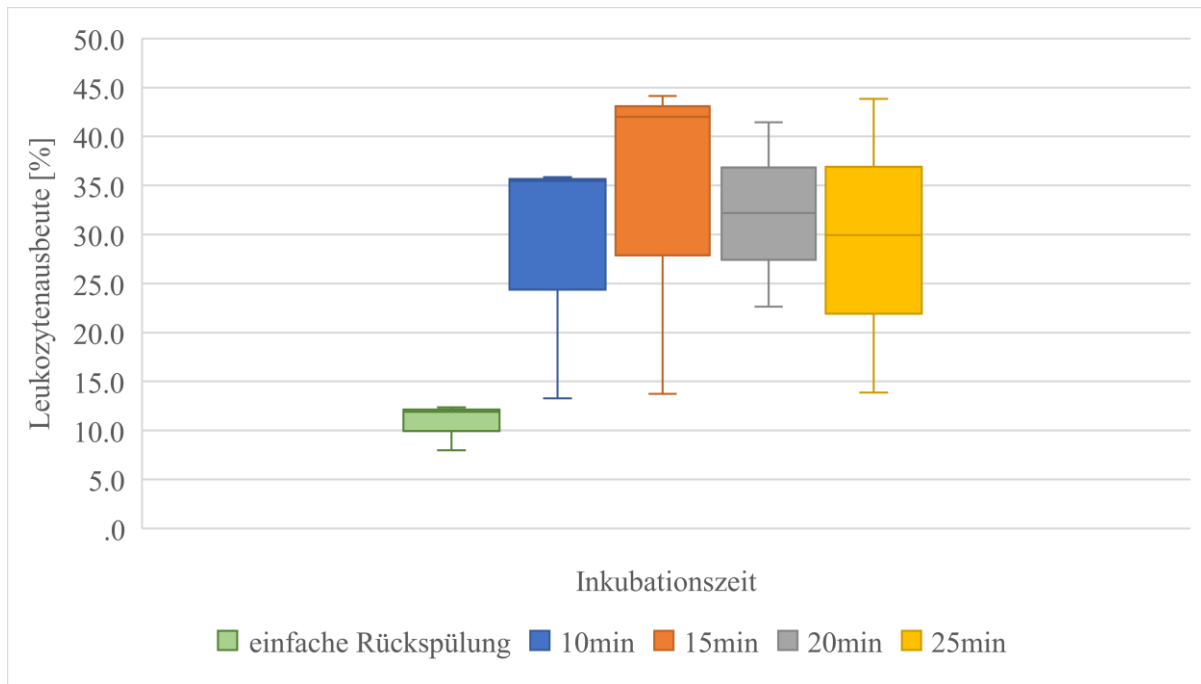


Abb. 19: Grafische Darstellung der Leukozytenausbeute (y-Achse in [%]) aus DONOpack-Filtern (Lmb Technologie) zu unterschiedlichen Inkubationszeiten mit Accutase sowie aus einfacher Rückspülung (x-Achse). Dargestellt sind Boxplots mit Median (Strich) mit minimalen und maximalen Ausreißern, 1. und 3. Quartil (Boxplot-Begrenzung), $n_{\text{Filter}} = 3$ je Inkubationszeit.

Abb. 19 zeigt die Ergebnisse der Analysen grafisch. Die höchste Ausbeute wurde bei 15-minütiger Inkubation erreicht (oranger Boxplot). Außerdem zeigt die grafische Darstellung die Steigerung der Leukozytenausbeute im Vergleich zur einfachen Rückspülung (grüner Boxplot). Bei der mikroskopischen Betrachtung der Blutausrüche zeigte sich, dass vor allem Granulozyten herausgespült wurden (Abb. 20, A). Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Zellschädigung aller Subpopulationen der Leukozyten mit zunehmender Inkubationszeit etwas zunahm. Zwischen der initialen Spülung und der Spülung nach einer Stunde konnte kein erkennbarer Unterschied hinsichtlich der Leukozytenmorphologie festgestellt werden, da keine Zunahme der Zellschädigung beobachtet werden konnte (Abb. 20, B).

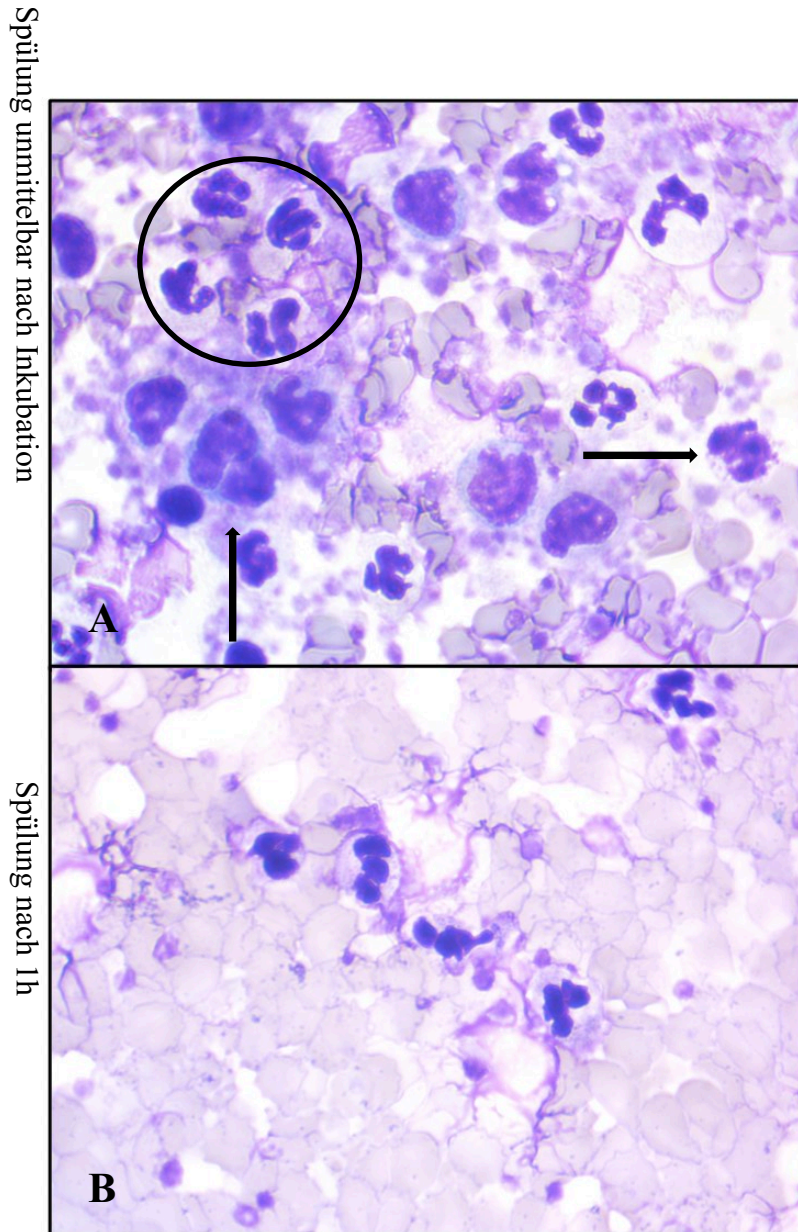


Abb. 20: Beispiel eines typischen Blutausstrichs bei Spülung eines DONOpack-Filters (Lmb Technologie) nach Inkubation mit Accutase (1000fache Vergrößerung, Färbung nach Pappenheim). **A:** Spülung unmittelbar nach der Inkubation mit Accutase. Zu erkennen sind viele Granulozyten (Kreis), die sich verformen und deren Zellgrenzen nicht mehr eindeutig abgegrenzt werden können. Weiterhin dargestellt sind Monozyten (vertikaler Pfeil) sowie stark verformte Zellen (horizontaler Pfeil). Einige Zellen zeigen morphologische Veränderungen wie Verformung und Vakuolisierung (vertikaler Pfeil). Außerdem sind nicht mehr identifizierbare Zellen zu finden. **B:** Spülung nach 1h. Die Granulozyten zeigen eine ähnliche Morphologie wie in A (mittig im Bild).

Im Anschluss wurden die Funktionstests (Tab. 8) durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse der vorherigen Versuchsreihe wurde für die Durchführung der Funktionstests eine Inkubationszeit von 15min ausgewählt.

Die Phagozytose-Fähigkeit wurde durch das Versetzen mit Accutase für 15min um mehr als 68% auf 18,6% im Vergleich zum Ausgangs-Buffy Coat reduziert, die Fähigkeit zum Oxidativen Burst um 67% auf 4,4%.

Tab. 8: Ergebnisse der Funktionsanalysen von Leukozyten des ungefilterten Buffy Coats und des Buffy Coats nach Accutase-Inkubation von DONOpac-Filtern (Lmb Technologie) für 15min mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der Median (Interquartilsabstand), $n_{\text{Filter}} = 3$.

	Buffy Coat	Gefilterter Buffy Coat
Phagozytose-Fähigkeit [%]	87,4 (30,5)	18,6 (18,0)
Fähigkeit zum oxidativen Burst [%]	71,5 (40,0)	4,4 (11,2)

4.2.4 Ausbeute nach Thrombozytenreduktion des Buffy Coats

Im Versuch zur Thrombozytenreduktion des Buffy Coats wurden sechs Filter getestet. Bei drei Filtern wurde nach der Thrombozytenreduktion das Volumen mit Plasma ersetzt, bei drei Filtern mit 0,9% NaCl.

Bei der Versuchsreihe mit NaCl als Ersatz konnte die Thrombozytenzahl auf 58,8% des Ausgangswerts reduziert werden. Nach Aufteilung des thrombozytenreduzierten Buffy Coats in drei Anteile, lagen in jedem der drei Beutel $5,9 \times 10^8$ Leukozyten sowie $35,6 \times 10^9$ Thrombozyten vor, die über drei DONOpac-Filter gefiltert wurden. Durch die Spülung in Flussrichtung konnten bei einem Filter 49,4% der gefilterten Leukozyten gewonnen werden. Bei zwei weiteren Filtern waren die Spülungen in Flussrichtung leukozytenfrei. Bei der Spülung entgegen der Flussrichtung konnten im Median 26,7% der Leukozyten gewonnen werden. Dies entspricht einer absoluten Leukozytenzahl von $1,58 \times 10^8$.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde blutgruppenidentisches Fresh Frozen Plasma als Volumenersatz nach der Thrombozytenreduktion genutzt. Dort konnte die Thrombozytenzahl auf 59,0% des Ausgangswertes verringert werden. Es lagen $9,4 \times 10^8$ Leukozyten sowie $55,7 \times 10^9$ Thrombozyten in jedem Beutel zur Filtration vor. Durch die Rückspülung entgegen der Flussrichtung konnten hier im Median 14,5% der Leukozyten gewonnen werden. Dies

entspricht einer absoluten Zellzahl von $1,36 \times 10^8$. Bei der Spülung in Flussrichtung konnten keine Leukozyten gewonnen werden.

Die Steigerung der Ausbeute durch die Thrombozytenreduktion ist insgesamt im Vergleich zur einfachen Rückspülung statistisch signifikant ($p < 0,05$). Dabei wurde die gesamte relative Leukozytenausbeute nach der Thrombozytenreduktion des Buffy Coats im Mann-Whitney-U-Test mit der einfachen Rückspülung verglichen.

Bei der mikroskopischen Betrachtung nahm der Anteil an Granulozyten in den Rückspülungen im Vergleich zum Ausgangs-Buffy Coat zu. Der Anteil der Lymphozyten nahm etwas ab. Viele Zellen waren nicht mehr ihrer ursprünglichen Leukozyten-Subpopulation zuzuordnen. Dies war insbesondere bei der Versuchsreihe mit NaCl (Abb. 21) auffällig. Bei der Versuchsreihe mit Plasma konnten die meisten rückgespülten Zellen noch identifiziert werden.

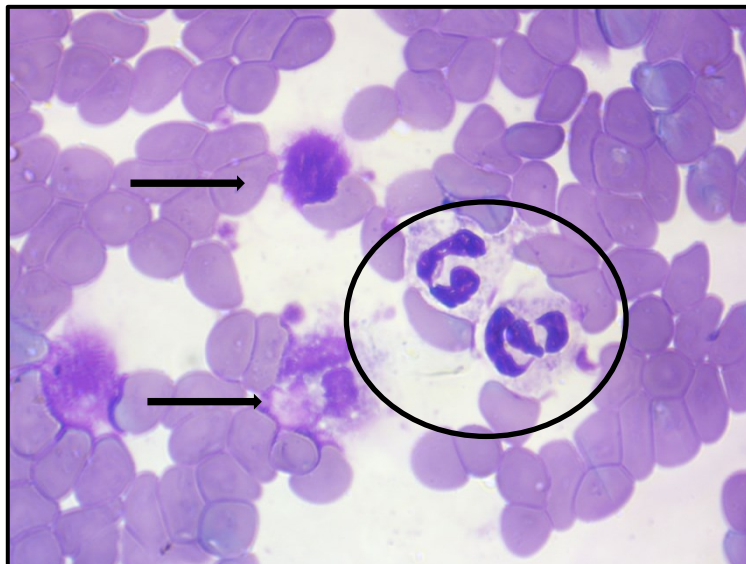


Abb. 21: Beispiel eines typischen Blutausstrichs nach Thrombozytenreduktion eines Buffy Coats, Ersatz des Überstandes mit 0,9% NaCl sowie Filtration über einen DONOpack-Filter von Lmb Technologie (1000fache Vergrößerung, Färbung nach Pappenheim). Zu erkennen sind verformte Erythrozyten sowie Granulozyten, deren Zellmembranen beschädigt scheinen (Kreis). Außerdem sind Zellen erkennbar, die nicht mehr einer bestimmten Leukozytenpopulation zugeordnet werden können (Pfeile).

4.3 Leukozytenrückgewinnung nach Filtration – Imugard® III RC von Terumo BCT

4.3.1 Filtrationsdauer, Filtrationsausbeute und Spülung in beide Flussrichtungen

Durch den Filtrationsprozess über einen Imugard® III RC-Filter entstanden im Median 41ml Filtrat. Dabei blieben 31ml des Buffy Coats im Filter zurück. Im Median war der Buffy Coat nach 180sec entleert. In den untersuchten Filtraten konnten keine Leukozyten nachgewiesen werden, sodass von einer vollständigen Leukozytendepletion ausgegangen werden kann.

In Tab. 9 wird die Leukozytenausbeute bei verschiedenen Spülschritten dargestellt. Dabei wurden drei Filter unter gleichen Bedingungen untersucht. Tab. 9 zeigt, dass $1,80 \times 10^8$ der gefilterten Leukozyten bei Spülung entgegen der Flussrichtung wieder herausgespült werden konnten (Tab. 9, 6. Zeile). Dies entspricht 16,0% der gefilterten Leukozyten. Dabei nahm die Leukozytenkonzentration mit den Spülschritten ab: Zuerst lag die Konzentration bei $1,1 \times 10^9/l$. Im letzten Spülschritt lag diese bei $0,7 \times 10^9/l$ (5. Zeile). Bei der Spülung in Flussrichtung konnten dagegen keine Leukozyten gewonnen werden (3. und 4. Zeile).

Tab. 9: Darstellung der Leukozytenausbeute bei Spülung von Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) mit 4 x 50ml 0,9% NaCl in und entgegen der Flussrichtung. Dargestellt ist der Median (Interquartilsabstand), $n_{\text{Filter}} = 3$.

	1. Schritt	2. Schritt	3. Schritt	4. Schritt	Gesamtausbeute
Spülschritt [ml]	50	50	50	50	200
Leukozytenkonzentration bei Spülung in Flussrichtung [$10^9/l$]	0 (0,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Gesamtausbeute bei Spülung in Flussrichtung [10^8]	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Leukozytenkonzentration bei Spülung entgegen der Flussrichtung [$10^9/l$]	1,1 (3,6)	1,1 (0,9)	0,9 (0,5)	0,7 (0,8)	5,9 (6,9)
Gesamtausbeute bei Spülung entgegen der Flussrichtung [10^8]	0,47 (1,52)	0,53 (0,47)	0,45 (0,25)	0,35 (0,40)	1,80 (2,64)

In Tab. 10 werden die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen dargestellt. Nach der Filtration wurde die Fähigkeit zur Phagozytose mit 97,9% bestimmt. Die Fähigkeit zum oxidativen Burst wurde mit 95,4% bestimmt.

Tab. 10: Ergebnisse der Funktionsanalysen von Leukozyten des ungefilterten Buffy Coats und des Buffy Coats nach Filtration über Imugard® III RC-Filter (Terumo BCT) mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der Median (Interquartilsabstand), $n_{\text{Filter}} = 3$.

	Buffy Coat	Gefilterter Buffy Coat
Phagozytose-Fähigkeit [%]	87,4 (30,5)	97,9 (3,4)
Fähigkeit zum oxidativen Burst [%]	71,5 (40,0)	95,4 (23,5)

Die Vitalitätsanalyse am NucleoCounter® ergab eine Leukozytenvitalität von 94,2%.

Die mikroskopische Betrachtung zeigte, dass die Verteilung der Subpopulationen der Leukozyten in den Rückspülungen denen des gefilterten Buffy Coats ähnelten. Allerdings stieg die Zahl der Zellen, die aufgrund von zunehmender Zelldestruktion nicht mehr sicher einer bestimmten Subpopulation zugeordnet werden konnten. Die Erythrozyten zeigten zunehmend eine Stechapfelform (Abb. 22).

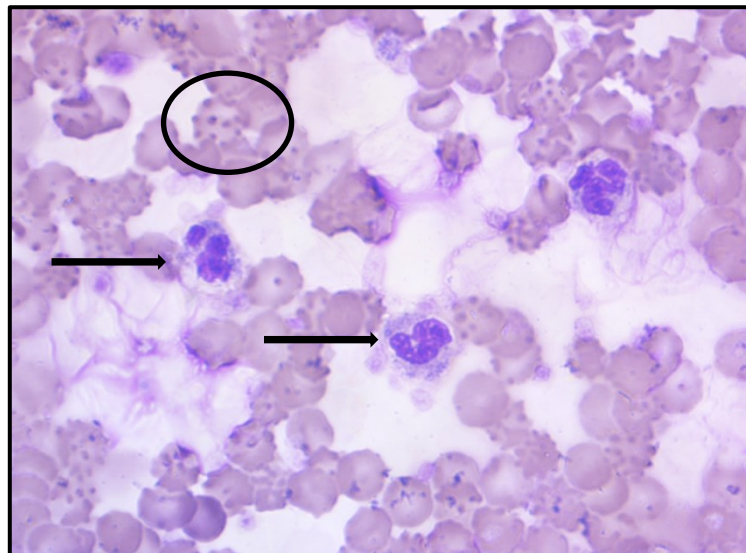


Abb. 22: Exemplarische Darstellung eines typischen Blutausstrichs bei Spülung eines Imugard® III RC-Filters (Terumo BCT) nach der Filtration (1000fache Vergrößerung, Färbung nach Papanheim). Zu erkennen sind Erythrozyten in Stechapfelform (Kreis) und Granulozyten, die sich zunehmend verformen und vakuolisieren (Pfeil).

4.3.2 Dissoziation mit Trypsin

Tab. 11 zeigt die Ausbeute und die Vitalität von Leukozyten aus dem Imugard® III RC-Filter nach der Inkubation mit Trypsin. Es wurden zwölf Filter (drei Filter je Inkubationszeit) unter gleichen Bedingungen untersucht.

Tab. 11: Darstellung der Leukozytenausbeute zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei Inkubation von Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) mit Trypsin mit steigender Inkubationszeit. Zusätzlich ist die Vitalitätsanalyse der jeweils gewonnenen Leukozyten nach initialer Spülung und am Folgetag aufgeführt. Dargestellt ist der Median (Interquartilsabstand) der herausgelösten Anteile bezogen auf die gefilterten Leukozyten, $n_{\text{Filter}} = 3$ je Inkubationszeit.

Inkubationszeit [min]	Herausgelös. Leukozyten initiale Spülung [%]	Vitalität initiale Spülung [%]	Herausgelöste Leukozyten nach 1h [%]	Herausgelöste Leukozyten 2. Tag [%]	Vitalität 2. Tag [%]	Gesamtausbeute [%]
10	5,9 (4,6)	80,5 (34,5)	6,4 (2,8)	5,2 (2,9)	31,4 (26,9)	15,7 (8,5)
15	3,1 (11,4)	54,6 (35,8)	5,6 (9,1)	6,3 (4,2)	27,3 (24,7)	14,9 (24,7)
20	3,2 (2,6)	81,4 (20,8)	7,6 (4,8)	6,6 (4,9)	30,1 (37,7)	18,6 (9,6)
25	5,6 (17,3)	62,5 (52,9)	4,6 (0,6)	4,8 (1,6)	37,8 (43,1)	15,2 (18,5)

Die größte Ausbeute konnte bei 20-minütiger Inkubation mit Trypsin beobachtet werden (Tab. 11, 7. Spalte). Mit 18,6% entspricht dies einer absoluten Zellzahl von $1,37 \times 10^8$. Die 10-, 15- und 25-minütigen Inkubationszeiten waren ähnlich effektiv. Bei der Spülung nach einer Stunde (Tab. 11, 4. Spalte) hatte die 25-minütige Inkubation die geringste Ausbeute. Die höchste Ausbeute konnte nach einer Stunde bei 20-minütiger Inkubationszeit erreicht werden, genauso wie bei Spülung am Folgetag (5. Spalte).

Die Ergebnisse der Vitalitätsanalysen sind ebenfalls in Tab. 11 dargestellt. Diese zeigt, dass die Vitalität durch die Filtration und Inkubation mit Trypsin im Vergleich zum Ausgangs-Buffy Coat am wenigsten bei 20-minütiger Inkubation abnahm, da diese mit 81,4% bestimmt wurde (3. Spalte). Bei 10min nahm die Vitalität um 14% auf 80,5%, bei 25min um 32% auf 62,5%

ab. Mit 39% nahm diese am stärksten bei 15-minütiger Inkubation ab. Außerdem zeigt Tab. 11, dass von der Messung nach der initialen Spülung bis zum Folgetag nochmals eine deutliche Vitalitätsreduktion stattfand (6. Spalte). Bei 10-minütiger Inkubationszeit sank diese um 49%. Ähnlich war es bei 20min, hier nahm die Vitalität um 51% ab, und bei 15min und 25min um 27% und 24%.

Eine weitere Besonderheit dieser Versuchsreihe war das Entstehen eines großen, geleeartigen Konglomerats (Abb. 23) bei der 1. Versuchsdurchführung. Dieses bildete sich beim 2. Spülungsschritt der 15-minütigen Inkubation im Überstand, welcher sich durch die Zentrifugation bildete. Das Konglomerat konnte restlos entfernt werden. Unter dem Mikroskop war eine Darstellung bis zur 400fachen Vergrößerung möglich. Diese Darstellung zeigte vor allem viele Erythrozyten. Eine Färbung war nicht möglich. Das gleiche Phänomen zeigte sich bei der 3. Versuchsdurchführung bei 15- und 25-minütiger Inkubation.



Abb. 23: Geleeartiges Konglomerat im Überstand der 2. Spülung bei 15-minütiger Inkubation eines Imugard® III RC-Filters (Terumo BCT) mit Trypsin.

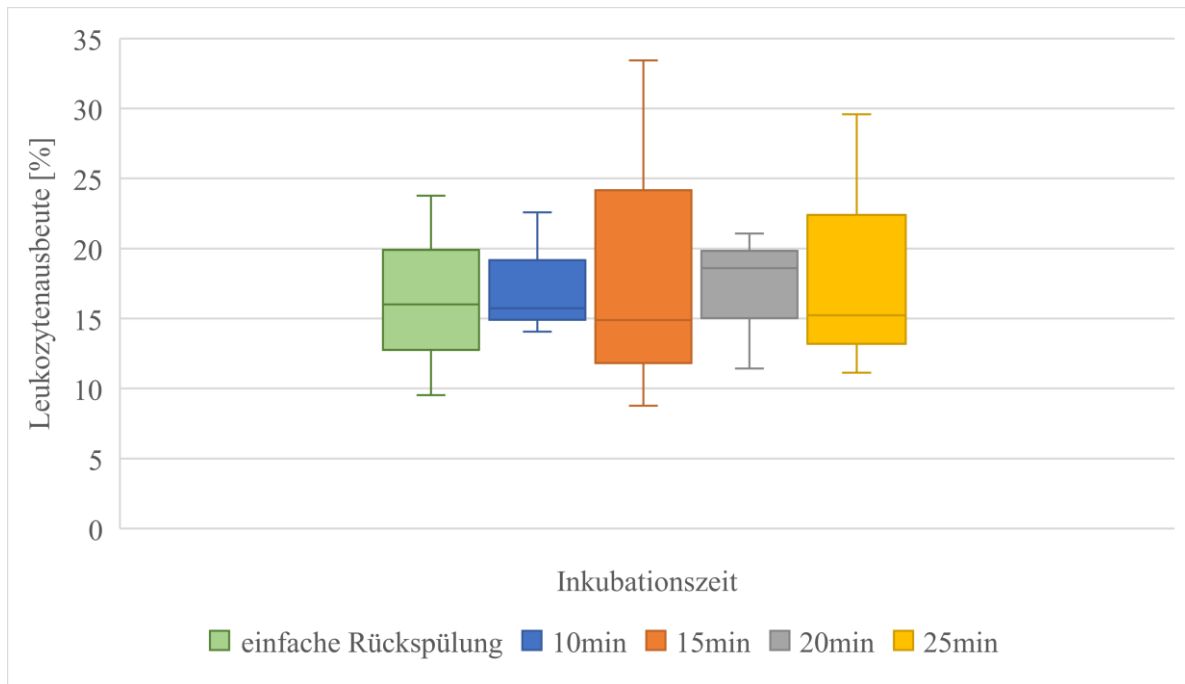


Abb. 24: Grafische Darstellung der Leukozytenausbeute (y-Achse in [%]) aus Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) zu unterschiedlichen Inkubationszeiten mit Trypsin sowie aus einfacher Rückspülung (x-Achse). Dargestellt als Boxplots mit Median (Strich) mit minimalen und maximalen Ausreißern, 1. und 3. Quartil (Boxplot-Begrenzung), $n_{\text{Filter}} = 3$ je Inkubationszeit.

Abb. 24 veranschaulicht die Ergebnisse aus Tab. 11 grafisch. Es wird deutlich, dass die Ausbeute bei jeder Inkubationszeit vergleichbar hoch ist. Trotzdem kann die 20-minütige Inkubation (grauer Boxplot) als effektivste Inkubationszeit gewertet werden. Außerdem wird deutlich, dass die Ausbeute durch die Inkubation mit Trypsin im Vergleich zur einfachen Rückspülung (grüner Boxplot) nur durch die 20-minütige Inkubation gesteigert werden konnte. Bei der mikroskopischen Betrachtung der Blutausrichie zeigte sich, dass sich in der Spülung ähnlich viele Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten befanden wie im Ausgangs-Buffy Coat. Außerdem konnte beobachtet werden, dass die morphologischen Anzeichen der Leukozyten für eine Zellschädigung mit zunehmender Inkubationszeit zunahmen. Dazu gehörte zum Beispiel die beginnende Lyse der Zellmembran (Abb. 25, A, Kreis). Weiterhin nahmen diese Anzeichen auch bei der Spülung nach einer Stunde zu (Abb. 25, B). In diesen Blutausrichien konnten bereits einige Zellen nicht mehr ihrer ursprünglichen Leukozytenpopulation zugeordnet werden (B, Kreise). Bei der Spülung am Folgetag konnte kein Unterschied zwischen den einzelnen Einwirkzeiten mit Trypsin festgestellt werden: Alle Proben zeigten eine hohe Anzahl an dicht gepackten, geschädigten Zellen. Häufig war die Zugehörigkeit zur ursprünglichen Population nicht mehr erkennbar (Abb. 25, C, Kreise).

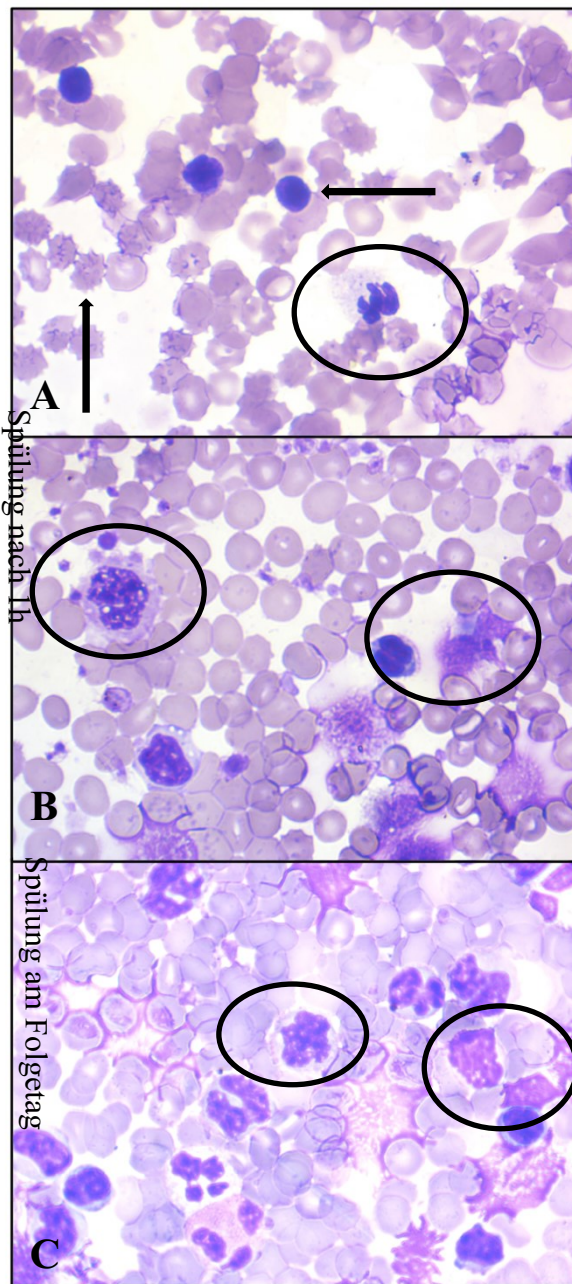


Abb. 25: Beispiel eines typischen Blutausstrichs bei Spülung eines Imugard[®] III RC-Filters (Terumo BCT) nach Inkubation mit Trypsin (1000fache Vergrößerung, Färbung nach Pappenheim). **A:** Spülung unmittelbar nach der Inkubation mit Trypsin. Zu erkennen sind einige normal geformte Lymphozyten (horizontaler Pfeil). Außerdem erkennbar sind stechapfelförmige Erythrozyten (vertikaler Pfeil). Ein Granulozyt ist zwar noch erkennbar, die Zellmembran ist jedoch bereits fast vollständig aufgelöst (Kreis). **B:** Spülung nach 1h. Zur erkennen sind vor allem Zellreste, die nicht mehr sicher der Ursprungspopulation zugeordnet werden können (Kreise). **C:** Spülung am Folgetag. Zu erkennen sind dichte Zellen, viele bereits geschädigte oder vollständig zerstörte Zellen, welche nicht mehr ihrer ursprünglichen Population zugeordnet werden können (Kreise).

In der darauf folgenden Versuchsreihe wurde der Einfluss der Inkubation mit Trypsin auf die Fähigkeiten zur Phagozytose sowie zum oxidativen Burst bei einer Inkubationszeit von 15min untersucht, um den Versuch vergleichbar mit dem DONOpack-Filter zu machen. Für die 15-minütige Inkubation sprach ebenfalls, dass bei der initialen Spülung nach der Trypsin-Inkubation ähnlich viele Leukozyten gewonnen werden konnten wie nach 20-minütiger Inkubation.

Dabei zeigte sich, dass sich sowohl die Fähigkeit zur Phagozytose sowie die Fähigkeit zum oxidativen Burst änderten (Tab. 12). Im Median sank die Phagozytose-Fähigkeit der Zielzellen um 81% im Vergleich zum Ausgangs-Buffy Coat. Nach der Rückspülung konnte diese mit 6,1% bestimmt werden. Die Fähigkeit zum oxidativen Burst nahm um mehr als 69% ab und wurde mit 1,9% bestimmt.

Tab. 12: Ergebnisse der Funktionsanalysen von Leukozyten des ungefilterten Buffy Coats und des Buffy Coats nach Trypsin-Inkubation von Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) für 15min mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der Median (Interquartilsabstand), $n_{\text{Filter}} = 3$.

	Buffy Coat	Gefilterter Buffy Coat
Phagozytose-Fähigkeit [%]	87,4 (30,5)	6,1 (47,5)
Fähigkeit zum oxidativen Burst [%]	71,5 (40,0)	1,9 (10,8)

4.3.3 Dissoziation mit Accutase

In der tabellarischen Darstellung (Tab. 13) der Leukozytenrückgewinnung nach Accutase-Inkubation der Imugard® III RC-Filter ist erkennbar, dass die 25-minütige Inkubation insgesamt am effektivsten war. Es wurden zwölf Filter (drei Filter je Inkubationszeit) untersucht. Betrachtet man die initiale Spülung (Tab. 13, 2. Spalte) direkt nach dem Einwirken, wurde die größte Leukozytenzahl nach einer Inkubation von 20min aus dem Filter gespült. Bei der Spülung nach einer Stunde (3. Spalte) lag die höchste Ausbeute bei 25min. Nur zehn min zu inkubieren war nicht ergiebig.

Die Steigerung der Ausbeute durch die Inkubation mit Accutase ist im Vergleich zur einfachen Rückspülung statistisch signifikant ($p < 0,05$). Dabei wurde die gesamte relative Leukozytenausbeute durch die Inkubation mit Accutase im Mann-Whitney-U-Test mit der einfachen Rückspülung verglichen.

Tab. 13: Darstellung der Leukozytenausbeute zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei Inkubation von Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) mit Accutase mit steigender Inkubationszeit sowie die Vitalitätsanalyse der Leukozyten nach 25-minütiger Inkubation. Dargestellt ist der Median (Interquartilsabstand) der herausgelösten Anteile bezogen auf die gefilterten Leukozyten, n_{Filter} = 3 je Inkubationszeit.

Inkubationszeit [min]	herausgelöste Leukozyten initiale Spülung [%]	Vitalität initiale Spülung [%]	herausgelöste Leukozyten nach 1h [%]	Gesamt- ausbeute [%]
10	13,1 (11,6)	-	7,6 (0,9)	20,6 (10,7)
15	22,6 (17,0)	-	8,9 (4,4)	31,5 (21,4)
20	25,6 (14,2)	-	9,1 (4,1)	32,2 (15,8)
25	24,3 (12,5)	92,5 (2,7)	11,1 (4,0)	34,4 (15,6)

Auf die Spülung am Folgetag wurde verzichtet. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für den nächsten Versuch – die Durchführung der durchflusszytometrischen Funktionstests – die Inkubationszeit von 25min ausgewählt, da diese die höchste Ausbeute erzielte. Absolut lag der Median der Ausbeute bei $3,11 \times 10^8$ Leukozyten. Die Vitalität wurde für die 25-minütige Inkubationszeit analysiert und mit 92,5% bestimmt.

Abb. 26. veranschaulicht, dass die Inkubation mit Accutase eine größere Ausbeute erzielte als die einfache Rückspülung (grüner Boxplot). Außerdem zeigt Abb. 26, dass die Ausbeute mit steigender Inkubationszeit zunahm (blau bis gelb).

Ergebnisse

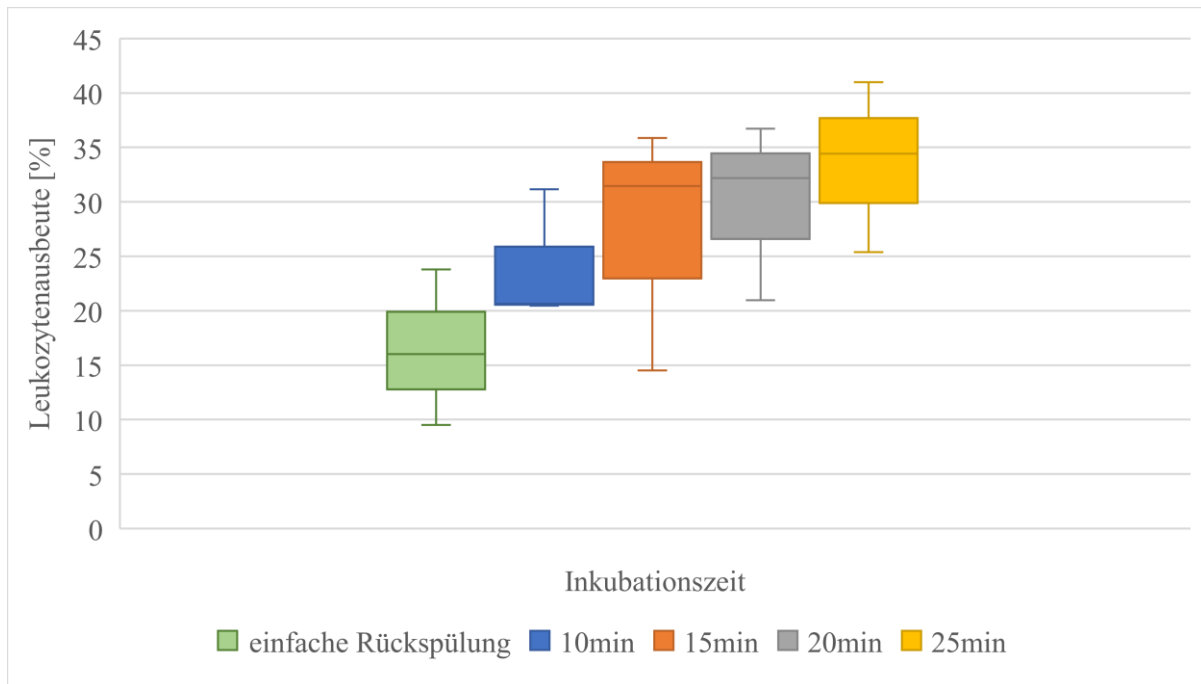


Abb. 26: Grafische Darstellung der Leukozytenausbeute (y-Achse in [%]) aus Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) zu unterschiedlichen Inkubationszeiten mit Accutase sowie aus einfacher Rückspülung (x-Achse). Dargestellt sind Boxplots mit Median (Strich) mit minimalen und maximalen Ausreißern, 1. und 3. Quartil (Boxplot-Begrenzung), $n_{\text{Filter}} = 3$ je Inkubationszeit.

In der darauffolgenden Versuchsreihe wurde der Einfluss der 25-minütigen Accutase-Inkubation auf die Phagozytose- und oxidativer Burst-Rate untersucht (Tab. 14). Der Median der Phagozytose-Fähigkeit nahm durch den Filtrationsprozess und das Versetzen mit Accutase für 25min im Vergleich zum Ausgangs-Buffy-Coat um 85% ab. Diese wurde nach der Filtration mit 2,3% bestimmt. Die Fähigkeit zum oxidativen Burst reduzierte sich dagegen um 70% auf 1,3%.

Tab. 14: Ergebnisse der Funktionsanalysen von Leukozyten des ungefilterten Buffy Coats und des Buffy Coats nach Accutase-Inkubation von Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) für 25min mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der Median (Interquartilsabstand), $n_{\text{Filter}} = 3$.

	Buffy Coat	Gefilterter Buffy Coat
Phagozytose-Fähigkeit [%]	87,4 (30,5)	2,3 (40,0)
Fähigkeit zum oxidativen Burst [%]	71,5 (40,0)	1,3 (0,5)

In der mikroskopischen Betrachtung der Blutausstriche wurde die 25-minütige Inkubation mit dem Ausgangs-Buffy Coat verglichen. Durch die Rückspülung konnten alle Populationen im gleichen Verhältnis wie im Ausgangs-Buffy Coat aus dem Filter gewonnen werden. Dabei fanden sich mehr deformierte Leukozyten mit porigen Membranen als im Ausgangs-Buffy Coat. Außerdem konnten einige Zellen nicht mehr ihrer ursprünglichen Population zugeordnet werden (Abb. 27, Pfeil).

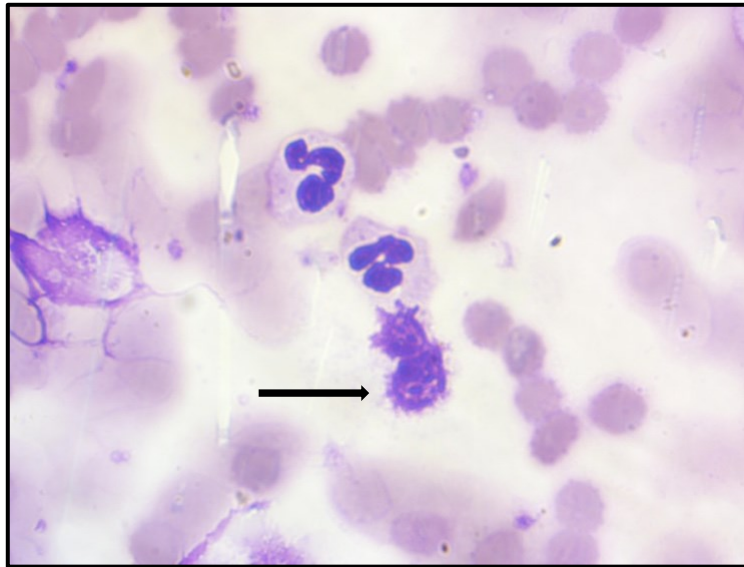


Abb. 27: Beispiel eines typischen Blutausstrichs nach Inkubation eines Imugard® III RC-Filters (Terumo BCT) mit Accutase für 25min (1000fache Vergrößerung, Färbung nach Pappenheim). Zellgrenzen der Granulozyten erkennbar, jedoch beginnende Deformierung (mittig im Bild). Darunter zwei nicht mehr identifizierbare Zellen (Pfeil).

4.3.4 Ausbeute nach Thrombozytenreduktion des Buffy Coats

Im Versuch zur Thrombozytenreduktion des Buffy Coats wurden sechs Filter getestet. Bei drei Filtern wurde nach der Thrombozytenreduktion das Volumen mit FFP ersetzt, bei drei Filtern mit 0,9% NaCl.

Durch die Thrombozytenreduktion mit NaCl-Ersatz konnte die Thrombozytenzahl auf 57,1% des Ausgangswertes reduziert werden. Über drei Filter wurde je ein Anteil des thrombozytenreduzierten Buffy Coats gefiltert. Bei jedem Ansatz lagen $9,8 \times 10^8$ Leukozyten sowie $40,5 \times 10^9$ Thrombozyten zur Filtration vor. Bei der Spülung in Flussrichtung konnten bei keinem der Filter Leukozyten gewonnen werden. Bei Spülung entgegen der Flussrichtung konnten im Median 25,6% der Leukozyten gewonnen werden. Dies entspricht einer absoluten Zellzahl von $2,51 \times 10^8$ Zellen. Im Vergleich zur einfachen Rückspülung ist die Ausbeute nach der Thrombozytenreduktion des Buffy Coats mit NaCl-Ersatz des Überstandes im Mann-Whitney-U-Test statistisch signifikant ($p < 0,05$).

In einem weiteren Versuch wurde der thrombozytenreiche Überstand durch blutgruppenidentisches FFP ersetzt. In diesem Fall konnte die Thrombozytenzahl auf 69,0% des Ausgangswertes herabgesetzt werden. Es wurden $7,5 \times 10^8$ Leukozyten sowie $52,8 \times 10^9$ Thrombozyten pro Filter nach der Thrombozytenreduktion gefiltert. Bei der Spülung in Flussrichtung waren keine Leukozyten nachweisbar. Durch die Rückspülung entgegen der Flussrichtung konnten im Median 20,1% der Leukozyten gewonnen werden. Dies entspricht einer absoluten Zellzahl von $1,51 \times 10^8$ Zellen.

Die Steigerung der gesamten Ausbeute durch die Thrombozytenreduktion ist im Vergleich zur einfachen Rückspülung statistisch signifikant ($p < 0,05$). Dabei wurde die gesamte relative Leukozytenausbeute nach der Thrombozytenreduktion im Mann-Whitney-U-Test mit der einfachen Rückspülung des Filters verglichen.

Bei der mikroskopischen Betrachtung der Blutausstriche zeigte sich, dass in den Rückspülungen deutlich mehr Granulozyten ausgezählt wurden als im Buffy Coat. Außerdem nahmen die Anzeichen für Zelledestruktion der Leukozyten, insbesondere die Verformung von Granulozyten, zu (Abb. 28, Kreis). Es waren intrazelluläre Vakuolen sowie aufgehobene Zellgrenzen erkennbar.

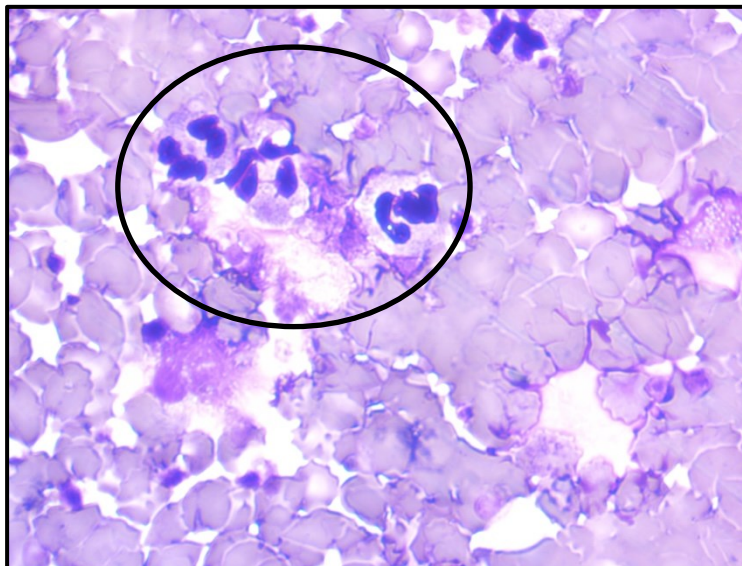


Abb. 28: Beispiel eines typischen Blutausstrichs nach Thrombozytenreduktion eines Buffy Coats, Ersatz des Überstandes mit 0,9% NaCl sowie Filtration über einen Imugard® III RC-Filter von Terumo BCT (1000fache Vergrößerung, Färbung nach Pappenheim). Zu erkennen sind verformte Erythrozyten sowie verformte Granulozyten (Kreis).

4.4 Vergleich der untersuchten Filter

4.4.1 Einfache Rückspülung

In Abb. 29 ist die Leukozytenausbeute nach der einfachen Rückspülung mit 200ml 0,9% NaCl von beiden Filtertypen im Vergleich dargestellt. Daraus wird ersichtlich, dass die Ausbeute nach Rückspülung des Terumo-Filters (blauer Boxplot) mit 16,0% höher lag als die des DONOpack-Filters (oranger Boxplot) mit 11,9%.

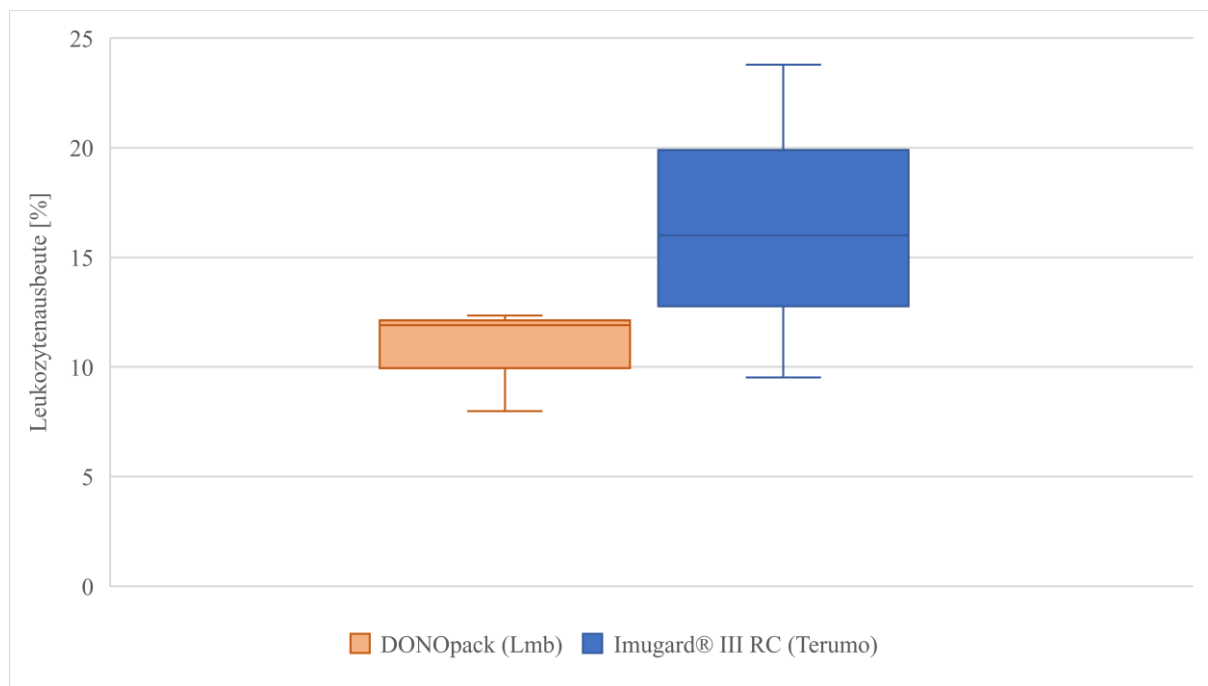


Abb. 29: Grafische Darstellung der Leukozytenausbeute (y-Achse in [%]) aus DONOpack-Filtern (Lmb Technologie, orange) und Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT, blau) nach Rückspülung mit 200ml 0,9% NaCl (x-Achse). Dargestellt als Boxplots mit Median (Strich) mit minimalen und maximalen Ausreißern, 1. und 3. Quartil (Boxplot-Begrenzung), $n_{\text{Filter}} = 3$ je Filtertyp.

Tab. 15 zeigt die Ergebnisse der Funktionalitäts- und der Vitalitätsmessungen der gewonnenen Leukozyten aus beiden Filtern im Vergleich. Die Phagozytose-Rate wurde für den DONOpack-Filter mit 92,2% bestimmt. Die Oxyburst-Rate lag bei 94,9%. Für den Terumo-Filter wurde die Phagozytose-Fähigkeit mit 97,9% gemessen, die Oxyburst-Fähigkeit mit 95,4% (2. und 3. Zeile). Die Leukozytenvitalität nach der Filtration wurde bei dem DONOpack-Filter mit 91,3% bestimmt, bei dem Terumo-Filter mit 94,2% (4. Zeile).

Tab. 15: Gegenüberstellung der Funktionalitäts- und Vitalitätsmessung von Leukozyten aus DONOpack-Filtern (Lmb Technologie) und Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) nach einfacher Rückspülung mit 0,9% NaCl. Abgebildet werden die Fähigkeit zur Phagozytose und zum oxidativen Burst, gemessen am Durchflusszytometer. Weiterhin dargestellt sind die Ergebnisse der Vitalitätsmessungen am NucleoCounter® NC-200TM. Dargestellt ist der Median (Interquartilsabstand), n_{Filter} = 3 je Filtertyp.

	DONOpack	Imugard® III RC
Phagozytose-Fähigkeit [%]	92,2 (4,7)	97,9 (3,4)
Fähigkeit zum oxidativen Burst [%]	94,9 (5,4)	95,4 (23,5)
Leukozytenvitalität [%]	91,3 (4,5)	94,2 (3,4)

In der mikroskopischen Betrachtung der Blutausstriche des DONOpack-Filters konnte ein Anstieg des Granulozytenanteils im Vergleich zum Blutausstrich des Ausgangs-Buffy Coats beobachtet werden. Dies wurde beim Terumo-Filter nicht beobachtet.

4.4.2 Dissoziation mit Trypsin

In Abb. 30 ist die Leukozytenausbeute nach Trypsin-Inkubation beider Filter gegenübergestellt. Die höchste Ausbeute aus dem DONOpack-Filter wurde nach 15-minütiger Inkubation erreicht. Durch diese Methode konnten 26,3% der Leukozyten aus dem Filter gewonnen werden (oranger Boxplot). Bei dem Terumo-Filter wurde die effektivste Ausbeute nach 20-minütiger Inkubation erreicht. Dabei konnten 18,6% der Leukozyten aus dem Filter gewonnen werden (blauer Boxplot). Die Funktionalitätsanalyse wurde bei beiden Filtern nach 15-minütiger Inkubation mit Trypsin durchgeführt.

Ergebnisse

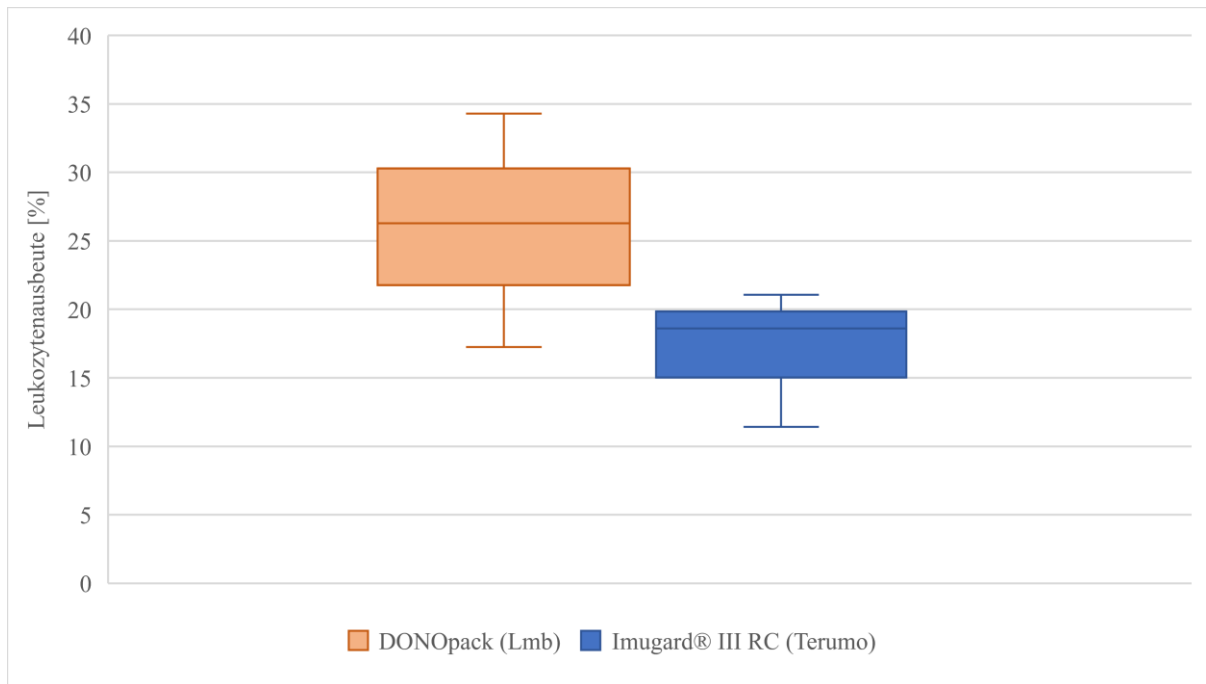


Abb. 30: Grafische Darstellung der maximalen Leukozytenausbeute (y-Achse in [%]) aus DONOpack-Filtern (Lmb Technologie, orange) und Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT, blau) nach Inkubation mit Trypsin für 15min (DONOpack) bzw. 20min (Terumo) (x-Achse). Dargestellt als Boxplots mit Median (Strich) mit minimalen und maximalen Ausreißern, 1. und 3. Quartil (Boxplot-Begrenzung), $n_{\text{Filter}} = 3$ je Filtertyp.

Tab. 16 zeigt, dass bei beiden Filtern die Fähigkeiten zur Phagozytose und zum oxidativen Burst niedrig waren (2. und 3. Zeile). Die Phagozytose-Rate der Leukozyten aus einem DONOpack-Filter wurde mit 5,8% bestimmt, bei Zellen aus dem Terumo-Filter mit 6,1%. Die Oxyburst-Rate wurde mit 5,3% bzw. 1,9% bestimmt. Die Vitalität der gewonnenen Zellen wurde beim DONOpack-Filter mit 80,8% gemessen. Nach der Inkubation des Terumo-Filters wurde die Leukozytenvitalität mit 54,6% ermittelt.

Tab. 16: Gegenüberstellung der Funktionalitäts- und Vitalitätsmessung von Leukozyten aus DONOpack-Filtern (Lmb Technologie) sowie Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) nach Inkubation mit Trypsin für 15min. Abgebildet werden die Fähigkeiten zur Phagozytose und zum oxidativen Burst, gemessen am Durchflusszytometer. Weiterhin dargestellt ist die Vitalitätsmessung am NucleoCounter® NC-200™. Dargestellt ist der Median (Interquartilsabstand), $n_{\text{Filter}} = 3$ je Filtertyp.

	DONOpack	Imugard® III RC
Phagozytose-Fähigkeit [%]	5,8 (4,8)	6,1 (47,5)
Fähigkeit zum oxidativen Burst [%]	5,3 (5,0)	1,9 (10,8)
Leukozytenvitalität [%]	78,0 (0,4)	54,6 (35,8)

In der mikroskopischen Betrachtung zeigte sich in den Blutausstrichen des DONOpack-Filters ein Anstieg des Granulozytenanteils im Vergleich zum Blutausstrich des Ausgangs-Buffy Coats. Dies wurde beim Terumo-Filter nicht beobachtet. Beim Terumo-Filter kam es zur Ausbildung von geleeartigen Konglomeraten. Dieses Phänomen trat beim DONOpack-Filter nicht auf.

4.4.3 Dissoziation mit Accutase

In Abb. 31 ist die maximale Leukozytenausbeute nach Accutase-Inkubation beider Filter gegenübergestellt. Durch diese Methode konnten 42,0% der Leukozyten aus DONOpack-Filtern gewonnen werden (oranger Boxplot). Die höchste Ausbeute konnte hier nach 15-minütiger Inkubation erreicht werden. Bei dem Terumo-Filter war die größte Ausbeute nach 25-minütiger Inkubation erreicht. Dabei konnten 34,4% der Leukozyten aus dem Filter gewonnen werden (blauer Boxplot).

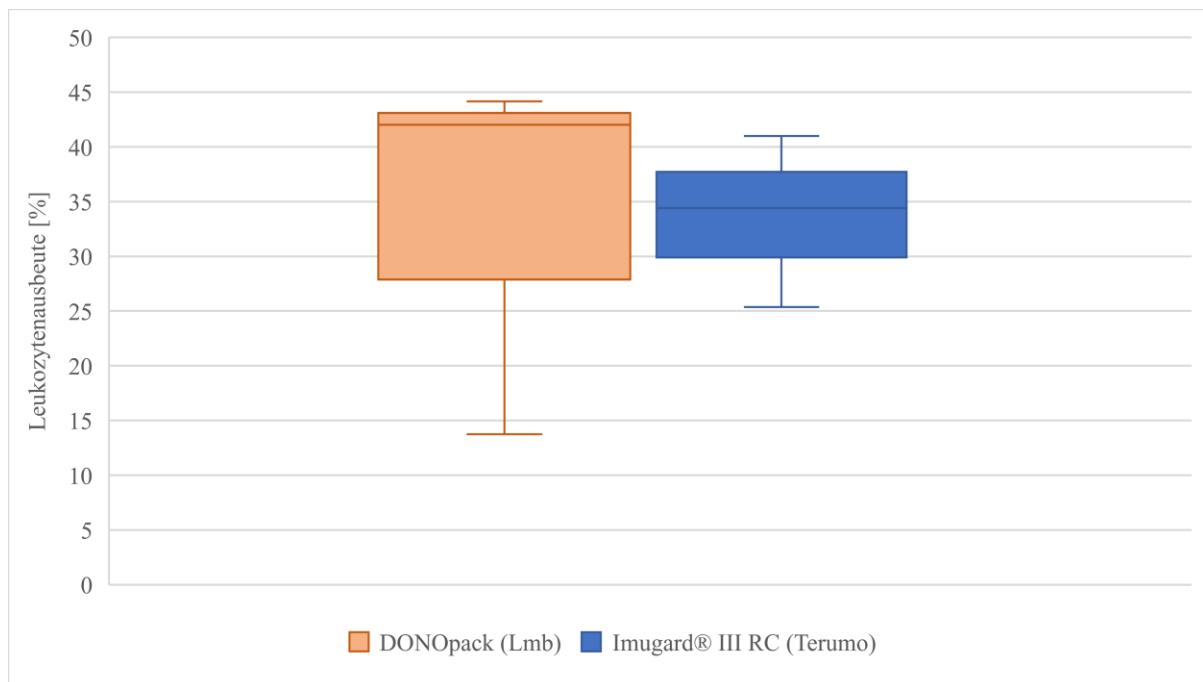


Abb. 31: Grafische Darstellung der maximalen Leukozytenausbeute (y-Achse in [%]) aus DONOpack-Filtern (Lmb Technologie, orange) und Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT, blau) nach Inkubation mit Accutase für 15min (DONOpack) bzw. 25min (Terumo) (x-Achse). Dargestellt als Boxplots mit Median (Strich) mit minimalen und maximalen Ausreißern, 1. und 3. Quartil (Boxplot-Begrenzung), $n_{\text{Filter}} = 3$ je Filtertyp.

Tab. 17 zeigt, dass bei beiden Filtern die Fähigkeiten zur Phagozytose und zum oxidativen Burst niedrig waren (2. und 3. Zeile). Die Phagozytose-Rate der Leukozyten aus einem DONOpack-Filter wurde mit 18,6% bestimmt, bei Zellen aus dem Terumo-Filter mit 2,3%. Die

Oxyburst-Rate wurde mit 4,4% bzw. 1,3% bestimmt. Die Vitalität der gewonnenen Zellen wurde beim DONOpac-Filter nach 15-minütiger Inkubation mit Trypsin mit 93,3% gemessen. Nach der Inkubation des Terumo-Filters für 25min wurde die Leukozytenvitalität mit 92,5% gemessen.

Tab. 17: Gegenüberstellung der Funktionalitäts- und Vitalitätsmessung von Leukozyten aus DONOpac-Filtern (Lmb Technologie) sowie Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) nach Inkubation mit Accutase (DONOpac: 15min, Terumo: 25min). Abgebildet werden die Fähigkeiten zur Phagozytose und zum oxidativen Burst, gemessen am Durchflusszytometer. Weiterhin dargestellt ist die Vitalitätsmessung am NucleoCounter® NC-200™. Dargestellt ist der Median (Interquartilsabstand), $n_{\text{Filter}} = 3$ je Filtertyp.

	DONOpac	Imugard® III RC
Phagozytose-Fähigkeit [%]	18,6 (18,0)	2,3 (40,0)
Fähigkeit zum oxidativen Burst [%]	4,4 (11,2)	1,3 (0,5)
Leukozytenvitalität [%]	93,3 (18,2)	92,5 (2,7)

Bei der mikroskopischen Betrachtung der Blutausstriche zeigte sich beim DONOpac-Filter, dass vor allem Granulozyten herausgespült wurden. Beim Terumo-Filter war die Zusammensetzung gleich wie im Blutausstrich des Ausgangs-Buffy Coats.

4.4.4 Thrombozytenreduktion des Buffy Coats

In Abb. 32 ist die Leukozytenausbeute nach Filtration eines thrombozytenreduzierten Buffy Coats und Rückspülung beider Filter gegenübergestellt. Dabei ist der Volumenersatz mit FFP links abgebildet, der Ersatz mit 0,9% NaCl rechts. Bei dem Volumenersatz mit FFP konnte die höhere Ausbeute beim Terumo-Filter erreicht werden (Abb. 32, blauer Boxplot). Diese lag bei 20,1%. Bei Rückspülung des DONOpac-Filters konnten bei dieser Methode 14,5% der Leukozyten gewonnen werden (oranger Boxplot). Bei Volumenersatz mit 0,9% NaCl lag die Ausbeute des DONOpac-Filters etwas höher. Diese wurde mit 26,7% bestimmt (Abb. 32, gelber Boxplot). Beim Terumo-Filter wurde die Ausbeute mit 25,6% bestimmt (grüner Boxplot). Die untere Begrenzung des Boxplots und der Ausreißer sowie der Median haben beim grünen Boxplot den gleichen Wert, sodass diese in der Abbildung nicht abgrenzbar sind. Bei beiden Filtern konnten anteilig mehr Granulozyten in den Blutausstrichen gezählt werden als im Buffy Coat.

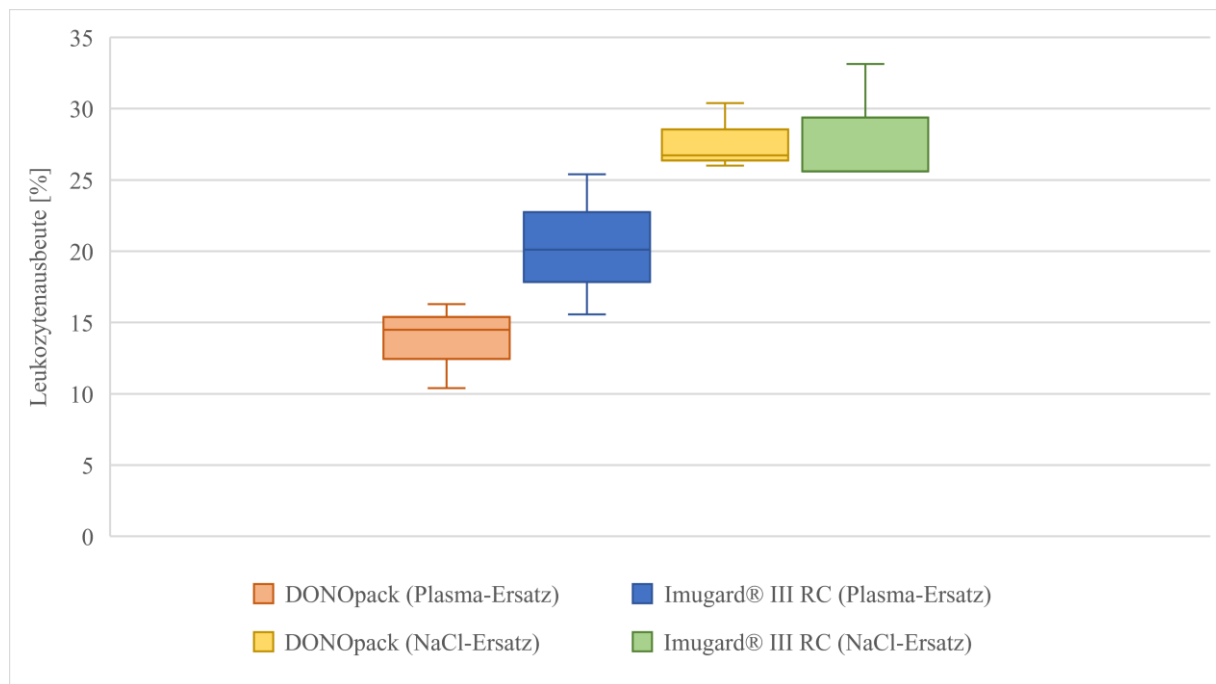


Abb. 32: Grafische Darstellung der maximalen Leukozytenausbeute (y-Achse in [%]) aus DONOpack-Filtern (Lmb Technologie) sowie Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) nach Thrombozytenreduktion des Buffy Coats (x-Achse). Dabei Überstandersatz mit Plasma in orange und blau, mit 0,9% NaCl in gelb und grün. Dargestellt als Boxplots mit Median (Strich) mit minimalen und maximalen Ausreißern, 1. und 3. Quartil (Boxplot-Begrenzung), $n_{\text{Filter}} = 3$ je Filtertyp.

4.5 Reaktion eines Buffy Coats auf Trypsin und Accutase

4.5.1 Reaktion auf Trypsin

Die Reaktion eines Buffy Coats auf Trypsin zeigte in drei Versuchsdurchführungen unterschiedliche Resultate. Es wurden drei Buffy Coats untersucht.

Während der 1. und 2. Durchführung der Versuchsreihe bildeten sich in den Proben der 10-, 20- und 25- minütigen Inkubation nach der Zugabe von Trypsin Konglomerate aus. Nur die 15-minütige Inkubation blieb ohne sichtbare Konglomeratbildung. Zwar konnten diese entfernt werden, jedoch zeigte sich in den Zellzahlbestimmungen am Sysmex, dass danach wenige bis keine Leukozyten in den Proben vorhanden waren (Tab. 18 und 19). Das gleiche Ergebnis zeigte sich in der Vitalitätsmessung am NucleoCounter®: Es konnte keine Vitalität ermittelt werden, da die Zellkonzentration für die Analyse zu gering war.

Tab. 18: Veränderung der Gesamtleukozytenzahl (absolut und prozentual) durch die Inkubation eines Buffy Coats mit Trypsin für 10, 15, 20, 25min, 1. Versuchsdurchführung, $n_{\text{Buffy Coat}} = 1$.

	Buffy Coat	10min	15min	20min	25min
Gesamt-Leukozytenzahl [$\times 10^8$]	0,46	0,10	0,00	0,00	0,00
Gesamt-Leukozytenzahl [%]	100,0	20,4	0,0	0,0	0,0

Tab. 19: Veränderung der Gesamtleukozytenzahl (absolut und prozentual) durch die Inkubation eines Buffy Coats mit Trypsin für 10, 15, 20, 25min, 2. Versuchsdurchführung, $n_{\text{Buffy Coat}} = 1$.

	Buffy Coat	10min	15min	20min	25min
Gesamt-Leukozytenzahl [$\times 10^8$]	0,53	0,00	0,35	0,50	0,50
Gesamt-Leukozytenzahl [%]	100,0	0,0	66,4	93,3	93,3

Auffällig war, dass beim 2. Versuch (Tab. 19) in einigen Proben Leukozyten nachgewiesen werden konnten, obwohl sich ähnliche Konglomerate wie beim 1. Versuch gebildet hatten.

Bei der 3. Versuchsdurchführung kam es nicht zur Konglomeratbildung. Die Leukozytenzahl (Tab. 20) reduzierte sich bei 15-, 20- und 25-minütiger Inkubation. Der prozentuale Anteil wurde mit 28,1% bis 41,8% berechnet. Bei 10-minütiger Trypsin-Inkubation wurde eine erhöhte Leukozytenzahl im Vergleich zum Buffy Coat gemessen. Der prozentuale Anteil wurde mit 107,8% berechnet.

Außerdem zeigt Tab. 20 die gemessene Leukozytenvitalität. Diese wurde bei 10-minütiger Inkubation mit 84,3% bestimmt. Bei 15- und 25-minütiger Inkubation konnte diese mit 95,4% bzw. 94,8% gemessen werden. Der niedrigste Wert der Vitalität wurde bei 20-minütiger Inkubation mit 80,3% gemessen.

Tab. 20: Veränderungen der Gesamtleukozytenzahl (absolut und prozentual) und der Leukozytenvitalität durch die Inkubation eines Buffy Coats mit Trypsin für 10, 15, 20, 25min, 3. Versuchsdurchführung, $n_{\text{Buffy Coat}} = 1$.

	Buffy Coat	10min	15min	20min	25min
Gesamt-Leukozytenzahl [$\times 10^8$]	0,93	0,99	0,26	0,39	0,34
Gesamt-Leukozytenzahl [%]	100,0	107,8	28,1	41,8	36,4
Vitalität [%]	97,1	84,3	95,4	80,3	94,8

Bei der Betrachtung der Blutausrichte zeigte sich eine Zunahme der Zellschädigung mit zunehmender Inkubationszeit (Abb. 33). Während im Buffy Coat noch der größte Teil der Zellen intakt war, zeigte sich bei 20- und 25-minütiger Inkubation eine deutlich erhöhte Anzahl an bereits geschädigten Zellen. Einige Zellen konnten nicht mehr sicher identifiziert werden (vertikaler Pfeil). Weiterhin waren bei einigen Zellen die Zellgrenzen nicht mehr klar abgrenzbar. Es trat Zellinhalt aus (horizontaler Pfeil).

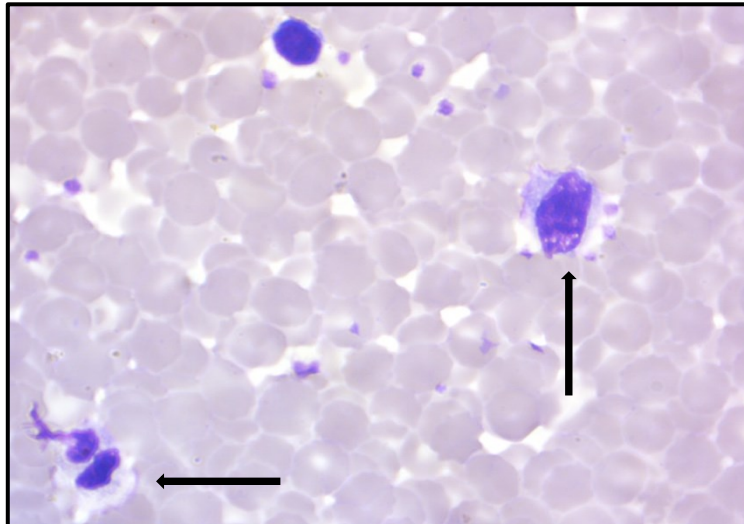


Abb. 33: Darstellung einiger Leukozyten bei Inkubation eines Buffy Coats mit Trypsin für 20min (1000fache Vergrößerung, Färbung nach Pappenheim): Während ein Lymphozyt sich noch normomorph darstellt, kann eine Zelle (vertikaler Pfeil) nicht mehr sicher identifiziert werden. Ein Granulozyt zeigt ebenfalls bereits Zeichen der Zerstörung (horizontaler Pfeil).

4.5.2 Reaktion auf Accutase

Die Reaktion auf Accutase wurde bei drei Buffy Coats untersucht. Es zeigte sich, dass die Leukozytenzahl durch die Inkubation mit Accutase reduziert wurde, allerdings geringer als durch Trypsin. Am stärksten nahm die Anzahl bei einer Inkubationsdauer von 20min ab, am geringsten bei 25min (Tab. 21, 2. und 3. Zeile). Die Messung der Vitalität des Buffy Coats vor der Inkubation lag bei 94,5%, nach der Inkubation zwischen 94,5% und 96,7% (Tab. 21, vierte Zeile).

Tab. 21: Darstellung der Veränderungen der Leukozytenzahl (absolut und prozentual) und der Leukozytenvitalität eines Buffy Coats nach Inkubation mit Accutase für 10, 15, 20, 25min. Dargestellt ist der Median (Interquartilsabstand), $n_{\text{Buffy Coat}} = 3$.

	Buffy Coat	10min	15min	20min	25min
Gesamt-Leukozytenzahl [$\times 10^8$]	0,79 (0,36)	0,59 (0,60)	0,61 (0,42)	0,57 (0,19)	0,72 (0,42)
Anteil des Buffy Coats [%]	100,0 (0,0)	79,5 (39,2)	77,8 (13,0)	71,4 (7,3)	87,0 (29,1)
Vitalität [%]	95,4 (2,4)	96,7 (3,3)	94,5 (3,5)	96,7 (1,7)	95,6 (2,5)

In der durchflusszytometrischen Analyse wurde ermittelt, dass sich der Einfluss der Accutase-Inkubation unterschiedlich auf die Phagozytose-Fähigkeit und den oxidativen Burst auswirkte. Dies wird in den beiden folgenden Diagrammen (Abb. 34 und 35) dargestellt. Abb. 34 zeigt, dass die Fähigkeit zur Phagozytose durch die Inkubation mit Accutase abnahm. Vor der Inkubation lag diese bei 87,4% (dunkelblauer Boxplot). Nach 10-minütiger Inkubation wurde die Phagozytose-Fähigkeit mit 35,1% bestimmt (orange). Nach 15min Inkubation sank die Fähigkeit zur Phagozytose auf 43,6% (grau) ab, nach 20min auf 54,8% (gelb). Nach 25min wurde diese mit 44,8% ermittelt (hellblau).

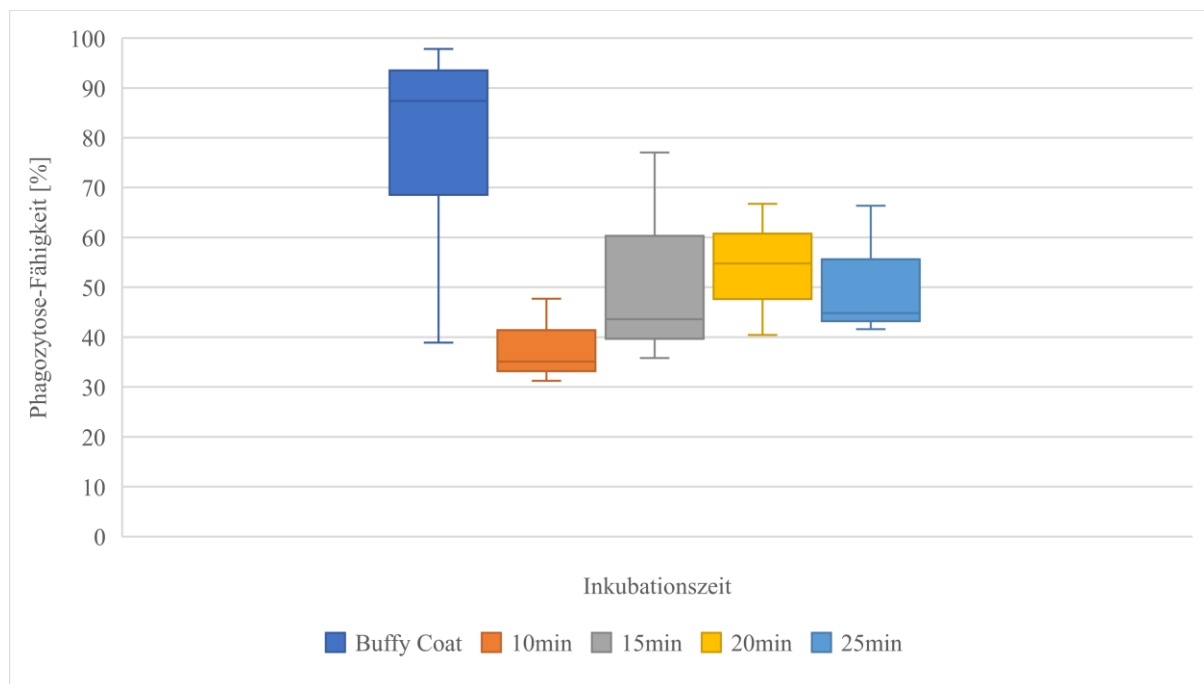


Abb. 34: Grafische Darstellung der Phagozytose-Fähigkeit (y-Achse in [%]) von Leukozyten aus Buffy Coats nach Inkubation mit Accutase für unterschiedliche Inkubationszeiten (x-Achse). Dargestellt sind Boxplots mit Median (Strich) mit minimalen und maximalen Ausreißern, 1. und 3. Quartil (Boxplot-Begrenzung), $n_{\text{Buffy Coat}} = 3$.

Vor der Inkubation lag die Fähigkeit zum oxidativen Burst bei 71,5%. Dies ist in Abb. 35 dargestellt. Der oxidative Burst wurde am stärksten bei einer Inkubationszeit von 10min beeinflusst (oranger Boxplot). Dieser Einfluss nimmt dann mit steigender Inkubationszeit ab (grau, gelb, hellblau). Bei 25-minütiger Inkubation liegt diese bei 76,4%.

Ergebnisse

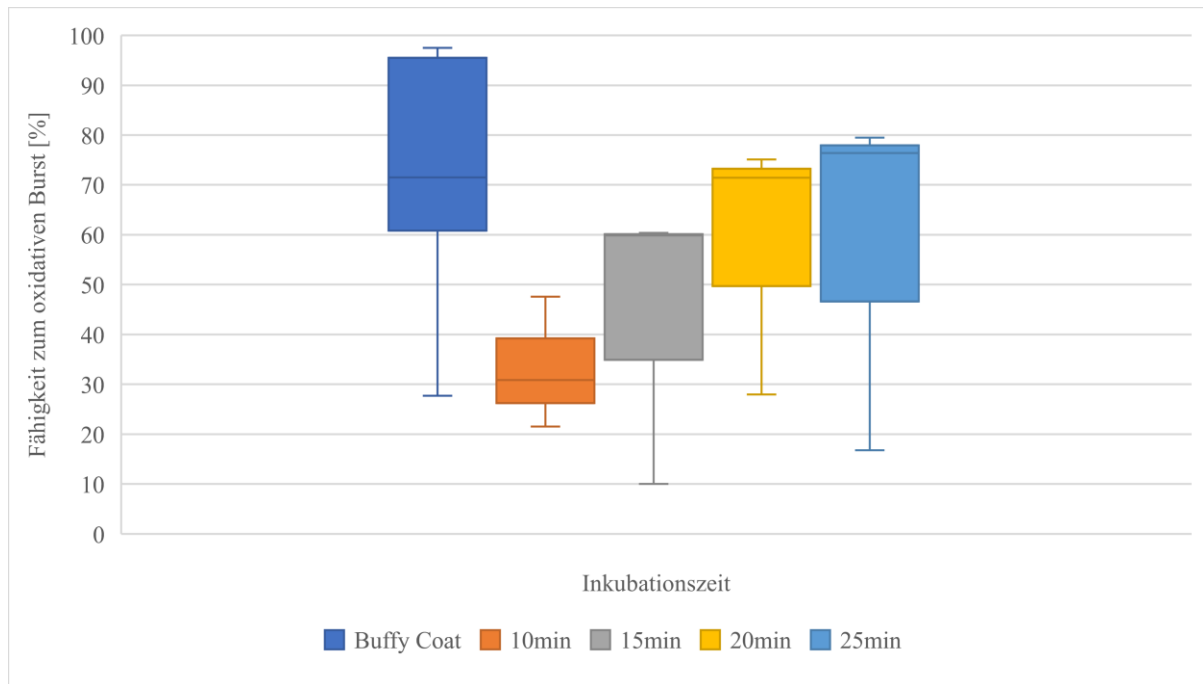


Abb. 35: Darstellung der Fähigkeit zum oxidativen Burst (y-Achse in [%]) von Leukozyten aus Buffy Coats nach Inkubation mit Accutase für unterschiedliche Inkubationszeiten (x-Achse). Dargestellt sind Boxplots mit Median (Strich) mit minimalen und maximalen Ausreißern, 1. und 3. Quartil (Boxplot-Begrenzung), $n_{\text{Buffy Coat}} = 3$.

In der mikroskopischen Auswertung der Blutausstriche (Abb. 36) konnte keine auffällige Veränderung festgestellt werden. Die anteilige Zusammensetzung der Leukozyten veränderte sich kaum. Lediglich eine diskrete Zunahme an pathologisch veränderten Zellen mit zunehmender Inkubationszeit war erkennbar. Allerdings konnte auch nach 25min Inkubation noch der größte Teil der Zellen als intakt gewertet werden.

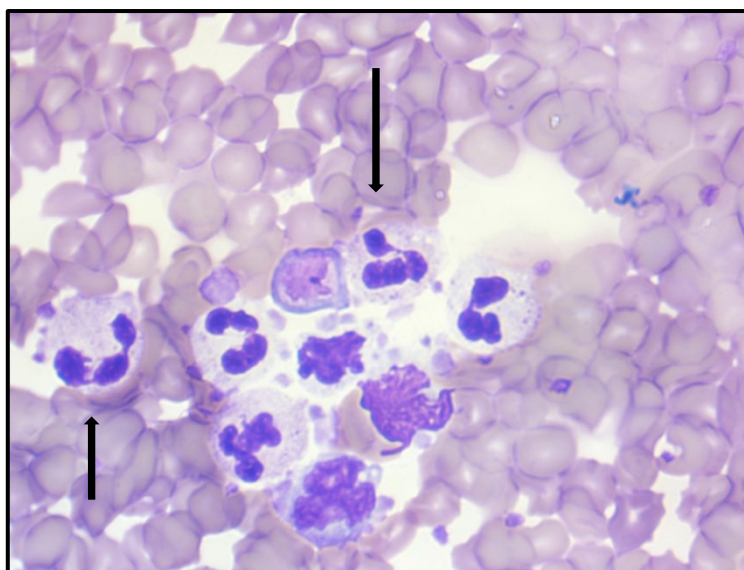


Abb. 36: Darstellung einiger Leukozyten bei Inkubation eines Buffy Coats mit Accutase für 25 min (1000fache Vergrößerung, Färbung nach Pappenheim): Während sich einige Zellen bereits verformen und die Zellgrenzen nicht mehr klar zu erkennen sind, zeigen die Granulozyten größtenteils noch ihr regelhaftes Aussehen (Pfeile).

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit soll die Anwendbarkeit von DONOpack-Filtern der Firma Lmb Technologie und von Imugard[®] III RC-Filtern der Firma Terumo BCT zur Leukozytengewinnung beurteilen. Weiterhin sollen Methoden gefunden und beurteilt werden, um die Leukozytenausbeute zu maximieren. Insbesondere Granulozyten sind dabei von Interesse. Zu den Methoden gehörten die Spülung in und entgegen der Flussrichtung, die Inkubation mit Trypsin und Accutase sowie die Thrombozytenreduktion des Buffy Coats vor der Filtration. Zusätzlich zur Ausbeute wurden die Methoden hinsichtlich des Einflusses auf die Leukozytenfunktionalität, -vitalität und -morphologie untersucht. Dabei konnte ermittelt werden, dass die Methode mit der höchsten Leukozytenausbeute die 15-minütige Inkubation eines DONOpack-Filtern (Lmb Technologie) mit Accutase ist. Allerdings ging dies mit einem erheblichen Funktionsverlust der Leukozyten einher. Im Vergleich dazu waren die anderen Methoden weniger effektiv. Bei dem Terumo-Filter konnte die höchste Ausbeute bei 25-minütiger Inkubation mit Accutase erreicht werden. Auch hier zeigte sich ein deutlicher Funktionsverlust der Zellen. Die Inkubation mit Trypsin steigerte beim DONOpack-Filter die Ausbeute, ging jedoch ebenfalls mit einem erheblichen Funktionsverlust einher. Bei der einfachen Rückspülung ohne dissoziative Stoffe konnten vitale, funktionsfähige Zellen gewonnen werden. Jedoch war die Ausbeute im Vergleich zur Verwendung von Trypsin und Accutase gering. Die Thrombozytenreduktion steigerte die Ausbeute im Vergleich zur einfachen Rückspülung, jedoch wirkte die Präparation auf die Zellen bereits destruktiv. Bei der Betrachtung der Reaktion eines ungefilterten Buffy Coats auf Accutase und Trypsin konnte außerdem festgestellt werden, dass die dissoziativen Stoffe auch ohne Filtration zytotoxisch wirken.

5.1 Beurteilung der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur

Aus dem Imugard[®] III RC-Filter von Terumo BCT konnten durch die einfache Rückspülung $1,80 \times 10^8$ Leukozyten gewonnen werden, was einer Ausbeute von 16,0% entspricht. Aus dem DONOpack-Filter der Firma Lmb Technologie waren insgesamt $1,93 \times 10^8$ Zellen herauslösbar. Dies entspricht einer Ausbeute von 11,9%. Bei beiden Filtern wurde die höchste Ausbeute durch die Inkubation mit Accutase erreicht. Aus dem Imugard[®] III RC-Filter konnten durch diese Methode $3,11 \times 10^8$ Leukozyten gewonnen werden, aus dem DONOpack-Filter $2,78 \times 10^8$ Leukozyten. Dies entspricht einer Steigerung der Ausbeute um 18% beim Terumo-Filter sowie 30% beim DONOpack-Filter.

Die Leukozytenausbeute in der vorliegenden Arbeit ist vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, konnten aus anderen Filtern zwischen $2,67 \times 10^8$ und $1,01 \times 10^9$ Leukozyten gewonnen werden (50–52,56–58). Dabei ist zu beachten, dass die in dieser Arbeit verwendeten Filter-Typen bisher noch nicht getestet wurden. Es fällt auf, dass die Leukozytenausbeute in der Literatur in der Regel als absolute Zellzahl angegeben wird. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl absolute als auch relative Angaben in Bezug auf den Ausgangs-Buffy Coat genutzt, da die Leukozytenkonzentrationen der untersuchten Buffy Coats durch eine große Spendervariabilität bereits große Differenzen aufwies (Tab. 1). Von einer ähnlich hohen Variabilität der Leukozytenzahl ist auch bei den genannten Arbeiten auszugehen, welche keine prozentualen Angaben zur Ausbeute machen. Es muss daher kritisch hinterfragt werden, ob durch die Methoden dieser Arbeitsgruppen auch relativ gesehen gute Leukozytenausbeuten erzielt werden konnten.

Im Gegensatz dazu machten einige Arbeitsgruppen aber auch Aussagen zur prozentualen Ausbeute. Shukla et al. geben an, 24-34% der gefilterten Leukozyten aus Filtern der Marke Terumo Imuflex WP-SP (Terumo Corp., Tokio, Japan) sowie aus Haemometrics Leukozytenreduktionsfiltern (Leukotrap® WB-System, USA) gewinnen zu können (58). Rashidbaigi et al. geben an, mit ihrer Methode mittels 500ml Ammoniumchlorid 30-40% der Zellen nach Filtration einer Vollblutspende aus einem Filter gewinnen zu können. Diese Methode scheint auch der Dissoziation mit Trypsin überlegen zu sein, da dies von der Arbeitsgruppe ebenfalls getestet wurde. Sie machen jedoch keine konkreten Angaben zu den Ergebnissen der Trypsinanwendung; diese wird nur genannt, eine konkrete Ausbeute wird nicht angegeben (100). Die Ergebnisse der Leukozytenausbeute der vorliegenden Arbeit sind mit denen von Shukla et al. sowie Rashidbaigi et al. vergleichbar. Dezfouli et al. konnten 17,7% der gefilterten Zellen gewinnen – jedoch bezieht sich diese Angabe auf periphere mononukleäre Zellen, sodass eine Vergleichbarkeit nicht gegeben ist (54).

Wie zuvor beschrieben tragen insbesondere drei Mechanismen zur Filtration bei: Die Adhäsion der Leukozyten am Filtermaterial, der Siebeffekt des Filters und die Adhäsion der Leukozyten an Thrombozyten (19). Das bedeutet, dass diesen drei Mechanismen durch die Rückspülung entgegen gewirkt werden muss, damit sich die Zellen vom Filtermaterial lösen. Insbesondere die Adhäsion der Leukozyten wird bei der Filtration durch viele Faktoren beeinflusst, wie zum Beispiel durch die Oberflächenbeschaffenheit und die Hydrophilie des Materials oder die Ladung des Filtermaterials und der Leukozyten (31,32,41). Aus diesem Grund wurden verschiedene Filter getestet.

Da durch die einfache Rückspülung nur 11-16% der Zellen gewonnen werden konnten, ist davon auszugehen, dass die gewählte Methode die genannten Mechanismen nicht ausreichend beeinflusst. Die Vitalität und Funktionalität der Leukozyten blieben durch die Methode der einfachen Rückspülung allerdings erhalten.

Der Siebeffekt des Filters wird vor allem durch die Porengröße des Filtermaterials beeinflusst und wird daher bei bereits hergestellten Filtern mit den herkömmlichen Methoden nicht veränderbar sein, ohne die sonstigen Eigenschaften des Filters zu verändern, zum Beispiel den Filtrationserfolg oder die Erythrozytenausbeute (31,41).

Der dritte Mechanismus ist die Adhäsion von Leukozyten an Thrombozyten (31,42,43). Durch die Thrombozytenreduktion des Buffy Coats vor der Filtration sollte dieser Effekt vermindert und indirekt eine Steigerung der Leukozytenausbeute herbeigeführt werden. Aus dem DONOpac-Filter konnten 26,7% der Leukozyten bei NaCl-Ersatz und 14,5% bei Plasma-Ersatz durch Rückspülung gewonnen werden. Die Ausbeute konnte also im Vergleich zur einfachen Rückspülung um 3% bzw. 14% gesteigert werden. Bei dieser Methode ist jedoch zu beachten, dass auch bei einem Versuch während der Spülung des DONOpac-Filters in Flussrichtung Leukozyten nachweisbar waren. Es wäre denkbar, dass durch die Reduktion der Thrombozytenzahl keine vollständige Leukozytendepletion mehr gewährleistet werden kann, da dies einen zentralen Filtrationsmechanismus darstellt. Aus dem Imugard[®] III RC-Filter konnten 25,6% der Ausgangsleukozyten bei NaCl-Ersatz und 20,1% bei Plasma-Ersatz gewonnen werden. Dies entspricht einer Steigerung um 9% bzw. 4% im Vergleich zur einfachen Rückspülung. Die mikroskopische Betrachtung bei beiden Filtern zeigte jedoch, dass die Zellestrukturen im Vergleich zur einfachen Rückspülung vermehrt aufgetreten war. Die Präparationstechnik des Buffy Coats führt also auch ohne Verwendung von dissoziativen Stoffen bereits zur vermehrten Zellschädigung. Für eine genauere Beurteilung der Funktionalität müssten die Messungen der Phagozytose-Fähigkeit und der Fähigkeit zum oxidativen Burst erfolgen, um diese mit der einfachen Rückspülung zu vergleichen.

Um die Adhäsion der Leukozyten an das Filtermaterial weiter zu reduzieren als durch die einfache Rückspülung möglich, wurden dissoziative Stoffe untersucht. Speziell wurde die Inkubation mit Trypsin und Accutase genutzt. Trypsin ist eine Serinprotease, welche häufig bei der Arbeit mit Zellkulturen genutzt wird, um Zellen von den Medien zu lösen. Dabei bewirkt es eine hydrolytische Spaltung von Proteinen, insbesondere, wenn an der Proteinbindung Lysin oder Arginin beteiligt sind (87). In hohen Konzentrationen ist Trypsin zellmembranschädigend und kann zum Zelltod führen (101). Die Inkubation mit Trypsin führt außerdem zur Zellzahlreduktion (102). Dabei ist die genaue Reaktion auf Trypsin abhängig von der

verwendeten Zellart (103). Accutase kann als Alternative zu Trypsin eingesetzt werden, um adhärenente Zellen abzulösen. Es handelt sich dabei um ein proteolytisch und kollagenolytisch wirksames Enzymgemisch. Es soll eine weniger zytotoxische Wirkung als Trypsin haben (86–88). Ziel dieser Versuche war es, die Adhäsion der Leukozyten an das Filtermaterial durch die proteolytischen Eigenschaften des Trypsins und der Accutase zu vermindern. Diese wird durch verschiedene Proteine, Liganden, Rezeptoren und durch Chemotaxis katalysiert (31,39,40). Ein wichtiger Mediator dieser Bindung ist dabei das Glykoprotein L-Selektin, welches auf fast allen Leukozyten exprimiert wird (104–106). Selektin ist ein Transmembranprotein, welches aus mehreren Domänen besteht (107–109). Selektin könnte eine Zielstruktur des Trypsins sein. Da die genaue Zusammensetzung der Inhaltsstoffe von Accutase nicht bekannt ist, kann die exakte Zielstruktur von Accutase nicht benannt werden. Da Accutase als Alternative zum Trypsin verwendet werden kann, ist ein ähnlicher Wirkmechanismus anzunehmen.

Durch die Trypsin- und Accutase-Inkubation kann die Leukozytenausbeute gesteigert werden. Nach der Accutase-Inkubation konnten 42,0% (DONOpack) bzw. 34,4% (Terumo) der Leukozyten gewonnen werden. Dies entspricht einer Steigerung von 30% bzw. 18% im Vergleich zur einfachen Rückspülung. Durch die Spülung mit Trypsin konnten 26,3% bzw. 18,6% der Zellen gewonnen werden, was einer Steigerung im Vergleich zur einfachen Rückspülung um 14% bzw. 2% entspricht. Allerdings ging dies mit einem Funktionsverlust der Zellen im Hinblick auf die Fähigkeiten zur Phagozytose und zum oxidativen Burst einher. Bei Trypsin wurde auch die Vitalität der Zellen reduziert, sodass diese unter 90% lag. Bei Accutase blieb die Vitalität der herausgespülten Zellen erhalten. Das bedeutet, dass die Adhäsion durch die dissoziativen Stoffe reduziert werden kann. Die Reduktion der Funktionalität könnte darin begründet sein, dass Rezeptoren, die für die Initiierung der Phagozytose bzw. des oxidativen Bursts benötigt werden, enzymatisch geschädigt werden. Beispielsweise besteht der leukozytäre Fc-Rezeptor, der für die Erkennung der Opsonine verantwortlich ist, aus Proteindomänen (110,111). Diese könnten durch Accutase oder Trypsin gespalten werden. Andererseits wäre es auch möglich, dass die vitalen, adhärenenten Zellen im Filter verbleiben und die funktionsärmeren Zellen herausgespült werden.

Ein auffallender Aspekt der vorliegenden Arbeit ist, dass die Ausbeute nach Inkubation mit Accutase um 15% höher war als nach Inkubation mit Trypsin. Dies ist besonders bemerkenswert vor dem Hintergrund, dass die Gesamtvolumina der Rückspülung bei der Accutase-Inkubation um 135ml geringer waren als bei der Trypsin-Inkubation: Bei Accutase wurde mit 200ml PBS gespült, bei Trypsin mit 335ml 0,9% NaCl sowie blutgruppenidentem FFP. Hintergrund dieser unterschiedlichen Spülvolumina ist, dass sich bereits bei den

Versuchen mit Trypsin zeigte, dass durch die Spülung am Folgetag fast ausschließlich destruierte Zellen gewonnen werden konnten. Dies wurde auch dadurch ersichtlich, dass der Sysmex KX-21N nur eine geringe Leukozytenkonzentration maß, in den Blutaussstrichen jedoch deutlich mehr Zellen gefunden werden konnten. Eine Zuordnung zu den Populationen der Leukozyten war meist nicht mehr möglich (Abb. 18 und 25). Denkbar wäre, dass die große Differenz zwischen der gemessenen und der beobachteten Zellzahl durch den schädigenden Einfluss des proteolytischen Enzyms Trypsin induziert wurde. Dies könnte in der vorliegenden Arbeit dazu geführt haben, dass die destruierten Zellen durch das Sysmex Hämatologie-System KX-21N nicht mehr als Leukozyten gemessen werden konnten, diese aber unter dem Mikroskop noch als solche erkennbar waren.

Eine andere Ursache für die starke Zelledestruktion am Folgetag könnte sein, dass die Zellen aufgrund der Lagerungszeit und der Lagerungsbedingungen im Filter geschädigt wurden. Um diese Bedingungen zu optimieren, erfolgte die Lagerung im Brutschrank bei 37°C. Außerdem wurde der Filter mit blutgruppenidentem Plasma gefüllt, um die Zellen in einem geeigneten Medium aufzubewahren. Dennoch verändern die Strukturen der Filter die Umgebungsbedingungen wie zum Beispiel die Ladung oder Hydrophilie (vergleiche Kapitel 1.2.3), sodass die Zellen trotz der Lagerungstemperatur und des Lagerungsmediums geschädigt werden könnten. Es ist möglich, dass die Zellen umso vitaler sind, je früher die Filter verarbeitet werden, da dies in einer anderen Arbeit beschrieben wurde: Izquierdo et al. konnten aus einem Leukozytendepletionsfilter WBF3 (Pall Medical, Tipperary, Irland) vitale Zellen gewinnen, allerdings nur, wenn die Filter innerhalb von drei Stunden nach der Filtration verarbeitet wurden (52).

Insbesondere bei dem Terumo-Filter fällt auf, dass die Trypsin-Inkubation keinen Vorteil in der Ausbeute im Vergleich zur einfachen Rückspülung erzielte (Abb. 24). Da sich in diesem Fall die in Abb. 23 dargestellten Konglomerate gebildet hatten, kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass diese weitere, nicht detektierbare Leukozyten enthielten. Die Färbung der Konglomerate war nicht möglich, da diese mehrschichtig auf dem Objektträger aufgetragen wurden und daher während des Färbeprotokolls nicht fixiert werden konnten. Eine mikroskopische Betrachtung, zum Beispiel unter einem Elektronenmikroskop, könnte Aufschluss über die zelluläre Zusammensetzung des Konglomerats geben. Eine Ursache für dieses Phänomen konnte nicht abschließend evaluiert werden. Denkbar wäre, dass es durch die Oberflächeneigenschaften des Filterinneren, über die wenig bekannt ist, und das Trypsin zu einer Aktivierung der Granulozyten kam. Durch diese Aktivierung bilden die Zellen Netze aus, die die Ursache für die Konglomeratbildung darstellen könnten – die Neutrophil extracellular

traps (NETs). Dies ist eine Form der Erregerabwehr von aktivierten neutrophilen Granulozyten, bei der das Chromatin der DNA kondensiert und netzartige Strukturen ausbildet und Histone, antimikrobielle Proteine und Enzyme enthält (12,112–114). Die sogenannte NETose kann durch viele verschiedene Rezeptoren und deren Liganden aktiviert werden. Neben der Erregerabwehr können durch die NETs zum Beispiel auch Gefäße verschlossen werden; außerdem sind sie bei der Bildung einer Thrombose beteiligt (115,116). Die NETs könnten also ein wesentlicher Mechanismus bei der Ausbildung der Konglomerate sein.

Weiterhin wäre es denkbar, dass durch die massive Zerstörung Calcium aus dem Zellinneren freigesetzt wurde. Die verwendete Citrat-Antikoagulation im Buffy Coat könnte dadurch antagonisiert werden, sodass die plasmatische Gerinnung einsetzte. Calcium ist ein wichtiger Bestandteil der plasmatischen Gerinnung. Es ist Bestandteil mehrerer Komplexe des endogenen und exogenen Wegs der Blutgerinnung und bindet diese an Zellmembranen (117). Citrat entfernt Calcium aus dem Blut, was aber durch erneute Gabe von Calcium rückgängig gemacht werden kann (118). Trypsin selbst ist calciumunabhängig, eine Antagonisierung des Citrats ist also nicht möglich.

Die Inkubation eines ungefilterten Buffy Coats mit Trypsin zeigte ebenfalls eine Konglomeratbildung. Hier könnte ebenfalls die Calcium-Freisetzung oder die NETose eine Rolle spielen. Es wurde allerdings auch durch In-vitro-Studien gezeigt, dass Leukozyten in Anwesenheit von Serum durch Kontakt mit Trypsin vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimieren. Wenn kein Serum enthalten ist, werden diese Moleküle nicht exprimiert (119). Dies könnte erklären, warum die Bildung des Konglomerats bei direktem Kontakt zwischen Trypsin und dem Buffy Coat aufgetreten ist. Hier waren noch Plasma und zahlreiche Thrombozyten enthalten. Bei dem Kontakt im Filter wurde das Plasma durch Spülen vor dem Versetzen mit Trypsin entfernt. Weiterhin ist bekannt, dass Trypsin die Faktoren des Komplementsystems aktivieren kann, vor allem C3 und C5 (120,121). C3 bindet in seiner aktivierten Form an einen Rezeptor, der die Phagozytose aktivieren kann (122,123). Die verschlechterte Phagozytose-Fähigkeit, die in der vorliegenden Arbeit ermittelt wurde, könnte also nicht nur in dem schädigenden Einfluss des Trypsins auf die Zelle oder die Rezeptoren, sondern auch in dem Phagozytose-Mechanismus selbst begründet sein. Außerdem können aktiviertes C3 und C5 auch Thrombozyten aktivieren, was zu einer Thrombusbildung führt (124). Dies könnte die Konglomeratbildung erklären.

Die Zellmorphologie von Spülungen, in denen keine Konglomeratbildung eintrat, zeigte, dass die Leukozyten stark geschädigt wurden. Auch wenn die Konglomerate restlos entfernt werden

konnten, wäre dieses Phänomen ein Ausschluss für die Verwendung der Methode in Therapie oder Forschung.

Dass Accutase eine weniger zytotoxische Wirkung hat als Trypsin, wurde auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Mit Accutase konnte in dieser Arbeit die höchste Ausbeute erreicht werden. Zwar wurde dabei die Funktionalität vermindert, jedoch konnte weiterhin eine Leukozytenvitalität mit über 88% gemessen werden; insbesondere auch bei den Inkubationszeiten, die eine größere Ausbeute als die einfache Rückspülung gezeigt hatten (DONOpack-Filter: 15min, Terumo-Filter: 25min). Eine andere Arbeitsgruppe wies bereits vorher nach, dass die Inkubation mit Accutase die Vitalität von Leukozyten kaum reduziert. Dabei wurden zum Teil auch längere Einwirkzeiten der Accutase durchgeführt, zum Beispiel 45min bei 37°C. Trotzdem blieb die Vitalität bei über 90% (125). Weiterhin existiert ein Protokoll zur Lösung von Makrophagen aus Kulturmedien, bei dem nur 10min bei 37°C mit Accutase inkubiert werden muss. In dem Fall resultiert ebenfalls nur wenig Zellestörung (126).

Allerdings wurde der Einfluss des Enzymgemischs auf Leukozyten ansonsten bisher kaum getestet. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Reaktion von ungefilterten Buffy Coat-Zellen auf Accutase untersucht. Es zeigte sich, dass die Vitalität durch die Inkubation nicht verändert wurde. Allerdings nahm die Leukozytenzahl zwischen 13,0% und 18,6% ab, sodass ein destruktiver Einfluss auf die Zellen auch bei Accutase aufgetreten sein könnte. Genauso wurde die Fähigkeit zur Phagozytose negativ beeinflusst. Die Fähigkeit zum oxidativen Burst war umso schlechter, je geringer die Inkubationszeit war. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass Accutase ähnlich wie Trypsin zu einer Aktivierung der Phagozytose führen könnte oder die für die Phagozytose relevanten Rezeptoren eine Zielstruktur der Accutase darstellen könnten (110,111,120–123). Warum Accutase bei Filtration der Zellen einen starken Einfluss auf die Funktionalität aber nicht auf die Vitalität hat, kann in dieser Arbeit nicht abschließend beurteilt werden. Eventuell werden für die Phagozytose wichtige Rezeptoren enzymatisch geschädigt.

Die einfache Rückspülung erzielte eine geringere Leukozytenausbeute als die Inkubation mit Trypsin oder Accutase, jedoch wurde dadurch weder die Vitalität noch die Funktionalität stark beeinflusst. Die Rückspülung des Imugard® III RC-Filters erzielte dabei prozentual die höhere Ausbeute. Allerdings konnte mikroskopisch ermittelt werden, dass im Blutausschlag mehr Granulozyten in Spülungen des DONOpack-Filters gezählt werden konnten. Das bedeutet, dass der Anteil der Granulozyten an der Gesamtleukozytenzahl im Vergleich zum ungefilterten Buffy Coat anstieg. Dies ist auch vereinbar mit der Literatur, denn es wurde beschrieben, dass

sich der größte Teil der Leukozyten in den ersten Schichten und in der letzten Schicht eines Filters sammeln. Granulozyten werden bereits früher beziehungsweise in den ersten Schichten gefiltert. Lymphozyten werden im Gegensatz dazu zum größten Teil erst in den späteren beziehungsweise letzten Schichten gefiltert (43,44). Daher wäre es denkbar, dass bei Rückspülung zunächst die Zellen aus den ersten Schichten herausgelöst werden können. Dabei ist jedoch zu beachten, dass eine mikroskopische Differenzierung der Zellen weniger genau ist als eine Differenzierung an einem Hämatologie-Analysator. Für die Herstellung eines Granulozytenkonzentrats für das ARTICE[®]-Verfahren würden also insbesondere die Filter von DONOpack in Frage kommen.

Die Vitalität wurde bei der einfachen Rückspülung und bei der Dissoziation mit Accutase kaum beeinflusst. Auch dies entspricht den Ergebnissen vieler anderer Arbeiten, in denen ebenfalls eine hohe Vitalität gemessen wurde (50,52,54,56,57,100). In einer Arbeit wurde ein statistisch signifikanter Unterschied in der Vitalität von gefilterten zu ungefilterten Zellen festgestellt (127). Im Gegensatz dazu konnte eine andere Arbeitsgruppe eine höhere Apoptoserate bei gefilterten Granulozyten beobachten (128).

Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, existieren weitere Methoden zur Leukozytenreduktion von Blutprodukten. Bei der Zentrifugation können 70% bis 90% der Leukozyten entfernt werden. Es kann zu einem Verlust von Erythrozyten kommen, sodass im Erythrozytenkonzentrat weniger Zellen enthalten sind. Dennoch ist diese Methode weit verbreitet, da sie einfach und effektiv ist (31). Trotzdem ist die Zentrifugation nicht geeignet, um transfusionsfertige Blutprodukte herzustellen, da noch Leukozyten enthalten sein können. Die Entfernung des Buffy Coats muss daher auch mit einer anschließenden Filtration kombiniert werden (129). Trotzdem könnte diese Methode geeignet sein, um Leukozyten für die Forschung oder Therapie zu gewinnen, insbesondere wenn viel Zellmaterial benötigt wird. Ähnlich verhält es sich mit der Sedimentation. Dabei können Blutprodukte um 80% der Leukozyten reduziert werden, die dann für Forschungszwecke genutzt werden könnten. Die Sedimentation ist einfach durchzuführen. Außerdem ist sie unabhängig von Laborgeräten. Allerdings ist diese Methode auch sehr zeitaufwendig (31). Im Gegensatz dazu benötigt die Zellwaschung spezielle Geräte. Auch wenn 70% bis 95% der Leukozyten entfernt werden können, ist die Zellwaschung dadurch im Vergleich zur Filtration aufwendiger. Außerdem sind die entstehenden Erythrozytenkonzentrate nur für 24h lagerbar (31,36). Ebenfalls teuer und vergleichsweise aufwendig ist die Methode des Einfrierens und Auftauens. Obwohl der Leukozytenanteil dabei um 95% reduziert werden kann, ist diese Methode nicht geeignet, um Leukozyten für die Therapie oder Forschung zu gewinnen, da die Leukozyten dabei zerstört werden (31,37). Für

die Leukozytengewinnung zu Forschungs- und Therapiezwecken wären neben der Filtration also nur die Sedimentation und die Zentrifugation geeignet. Diese Methoden müssten jedoch hinsichtlich der Funktionalität und Vitalität der gewonnenen Leukozyten beurteilt werden.

Um ein Granulozytenkonzentrat für die Anwendung im ARTICE[®]-Verfahren herzustellen, werden $1,25 \times 10^{10}$ Granulozyten benötigt. Bei einer Ausbeute von $1,93 \times 10^8$ Leukozyten aus einem DONOpack-Filter würden mindestens 65 Filter gebraucht, um zumindest die Anzahl durch alle Leukozytenpopulationen (Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten) erreichen zu können. Das bedeutet, um die erforderliche Zahl an Granulozyten zu erhalten, wäre eine noch größere Menge an Filtern nötig. Bei dem Terumo-Filter wären es mindestens 69 Filter, um die erforderliche Leukozytenzahl durch alle Populationen erreichen zu können. Dabei würde für den DONOpack-Filter sprechen, dass bei diesem mehr Granulozyten gewonnen werden konnten als beim Terumo-Filter.

Durch die Inkubation mit Accutase würden nur 45 DONOpack-Filter oder 40 Terumo-Filter benötigt werden, um die benötigte Leukozytenzahl durch alle Populationen zu erreichen. Für ein reines Granulozytenkonzentrat wäre die Anzahl entsprechend höher. Allerdings spricht die deutlich reduzierte Funktionalität gegen die Verwendung von Accutase. Da die Immunparalyse beim ARTICE[®]-Verfahren durch gesunde, funktionsfähige Granulozyten übernommen werden soll, wären die mittels Accutase-Inkubation gewonnenen Zellen nicht geeignet. Trypsin kommt aufgrund der gleichen Gründe nicht in Frage. Sowohl bei der einfachen Rückspülung als auch bei der Verwendung von Accutase wären die Präparation und die Rückspülung von derart vielen Filtern nicht handlungspraktikabel. Falls noch erhebliche Mengen an Resterythrozyten vorhanden wären, müsste die Kompatibilität der Blutgruppen bei der Auswahl der Filter bedacht werden. Es würde – je nach Größe der Blutbank – vermutlich mehrere Tage dauern, bis genügend Spender für ein Granulozytenkonzentrat rekrutiert werden könnten. Das bedeutet, dass die in dieser Arbeit vorgestellten Methoden keinen Vorteil gegenüber der bisherigen Probandenrekrutierung oder dem aktuellen Herstellungsaufwand für ein Granulozytenkonzentrat bietet, wenn die Herstellung zeitlich limitiert ist – zum Beispiel beim ARTICE[®]-Verfahren. Patienten können nicht abwarten, bis eine ausreichende Anzahl an Spendern rekrutiert wurde.

Vorteil der Verwendung von Leukozytendepletionsfiltern ist, dass die Filter als Abfallprodukt auftreten und daher die Herstellungskosten minimiert werden können. Die Filtration ist im Vergleich zu anderen Methoden leicht in den Arbeitsablauf eines Labors integrierbar und man benötigt keine weiteren Geräte. Wenn also Granulozytenkonzentrate für die Forschung hergestellt werden sollen, stellen Zellen aus Filtern eine Option dar.

5.2 Beurteilung der Methodik im Vergleich zur Literatur

Wie bereits zuvor beschrieben, ist die Leukozytenausbeute in der vorliegenden Arbeit vergleichbar mit Ergebnissen anderer Studien (50–52,56–58). Trotzdem existieren beachtliche Unterschiede, wie die Auswahl der Spülflüssigkeit für die Rückspülung. In der vorliegenden Arbeit wurde bei der einfachen Rückspülung sowie bei der Trypsin-Inkubation mit 0,9% NaCl gespült. Es wurde dabei 0,9% NaCl genutzt, da dieses zur möglichen Anwendung am Patienten geeignet und leicht verfügbar ist. Bei der Verwendung von Trypsin wurde im letzten Spülschritt blutgruppenidentisches Plasma verwendet. Die Spülung mit Plasma ist sinnvoll, da das im Plasma enthaltene α 1-Antitrypsin die Wirkung von Trypsin hemmt (85,130). So kann das Trypsin durch diesen Schritt inaktiviert werden. Bei der Inkubation mit Accutase wurde mittels Dulbecco's PBS (calcium- und magnesiumfrei) gespült, da dies von den Herstellern der Accutase empfohlen wird (86,88). Calcium- und magnesiumfreies PBS wird auch in zahlreichen anderen Arbeiten genutzt. Longley et al. konnten nach Spülung mit 250ml PBS $2,67 \times 10^8$ Leukozyten aus Leukotrap-Filtern (Cutter Biological, Berkeley, USA) gewinnen (56). He et al. spülten einen Filter aus einem De-leucocyte Plastic Blood Bag mit 50ml PBS, machten aber keine Angabe zur absoluten Zellzahl, die sie gewinnen konnten (128). Ebner et al. setzten dem PBS Dextran, Saccharose und Humanalbumin zu, machten allerdings auch keine Angabe zur Gesamtausbeute (53). Im Unterschied dazu verwendeten Meyer et al. EDTA und Saccharose als Zusätze im PBS. Die Ausbeute der Leukozyten nach Spülung von Filtern des Modells Leukoflex LST-1 (Macopharma, Tourcoing, Frankreich) und des Modells Compoflex T3908 (Fresenius Hemocare, Friedberg, Deutschland) jeweils mit 200ml dieser Lösung lagen bei $1,01 \times 10^9$ (50). Ferdowsi et al. nutzten ebenfalls diese Zusätze und konnten $4,4 \times 10^8$ Zellen aus einem Leukoflex LST-1 (Macopharma) gewinnen, allerdings nutzte diese Arbeitsgruppe nur 70ml Spülung (51). Eine ähnliche Zusammensetzung, allerdings ohne Dextran, nutzten Valizadeh et al. Die Arbeitsgruppe konnte damit $9,6 \times 10^8$ periphere mononukleäre Zellen nach Spülung von Leukoflex LCR5-Filtern (Macopharma) mit 200-250ml gewinnen (55). Wegehaupt et al. erreichten in 100ml Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) eine Leukozytenausbeute von $3,56 \times 10^8$. Die Arbeitsgruppe nutzte Terumo LR Express-Filter (57). Durch die Spülung mit 200ml NaCl ohne Zusätze konnten in der vorliegenden Arbeit $1,93 \times 10^8$ der Leukozyten beim DONOpack-Filter sowie $1,80 \times 10^8$ beim Terumo-Filter gewonnen werden. Damit sind diese Ergebnisse vergleichbar mit denen von Longley et al. Die Ausbeute ist jedoch geringer als bei Meyer et al. sowie Wegehaupt et al. Es fällt auf, dass in der vorliegenden Arbeit nach vier Spülschritten noch nicht alle Leukozyten gelöst wurden, da die Leukozytenkonzentration nach dem 4. Spülschritt größer als null ist (Tab. 3 und 9). Es wäre

daher gegebenenfalls sinnvoll, das Spülvolumen zu erhöhen, bis die gemessene Leukozytenkonzentration in den Spülungen null beträgt und somit alle löslichen Leukozyten herausgespült wurden.

Auffällig ist, dass die Ausbeute in dieser Arbeit sowie auch in den davor diskutierten Arbeiten hoch war, wenn mit PBS oder HBSS gespült wurde. Insbesondere Zusätze wie Zuckermoleküle oder EDTA scheinen die Ausbeute weiter zu steigern, auch wenn es Arbeiten gibt, die dieser Annahme widersprechen (50,58). In einer Arbeit von Dzik et al. wurde beschrieben, dass bestimmte Flüssigkeiten, wie zum Beispiel HBSS, die Oberflächenspannung von Filtern verändern können (41). Diese beeinflusst die Filtrationsmechanismen (vergleiche Kapitel 1.2.3). Es wäre also möglich, dass auch PBS die Oberflächenspannung dahingehend verändert, dass sich Zellen leichter vom Filtermaterial lösen lassen. Außerdem scheint insbesondere Dextran an der Gewinnung von Granulozyten beteiligt zu sein (131). Allerdings soll Dextran Granulozyten schädigen und deren Funktionalität einschränken (52).

In einigen Arbeiten wurden auch andere Methoden getestet, in denen die Zellen durch Geräte wie eine Vakuumpumpe oder ein Drucksystem mit Gas herausgespült wurden, und nicht mit – wie üblich – manuell bedienten Spritzen (54,58). Diese Geräte stellen eine Alternative zur hier dargestellten Methode mittels Spritze dar. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Vakuumpumpe zwar die Ausbeute steigert, die Lebensfähigkeit der Zellen allerdings einschränkt (54). Bei Rückspülung mittels Gasbewegung lag die Ausbeute bei $1,8\text{-}2,14 \times 10^8$ Leukozyten (58).

Des Weiteren könnte auch die Temperatur, bei denen die Versuche durchgeführt wurden, einen Einfluss auf den Erfolg der Rückspülung haben, denn diese beeinflusst auch den Filtrationserfolg (19,132). In der vorliegenden Arbeit wurde die einfache Rückspülung bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei der Dissoziation mit Trypsin wurde dieses auf 37°C im Wasserbad erwärmt, ebenso die Spülflüssigkeit 0,9% NaCl, der Buffy Coat und die jeweils verwendeten Filter. Die Filtration und die Rückspülung wurden bei Raumtemperatur vorgenommen. Die Inkubation der Filter wurde wiederum bei 37°C im Brutschrank durchgeführt, denn die optimale Temperatur für Trypsin liegt bei 37°C (87). Bei der Dissoziation mit Accutase wurden nur der Buffy Coat und die Spülung auf 37°C erwärmt. Außerdem erfolgte die Inkubation bei dieser Temperatur, da die Accutase nicht auf 37°C erwärmt werden soll, die Inkubation aber bei dieser Temperatur möglich ist (86,88). Longley et al. führten die Filtration bei 5°C durch und bewahrten den Filter bei 4°C bis zur Verarbeitung auf. Außerdem nutzen sie kalte Spülflüssigkeit (56). Wenn mit Ammoniumchlorid gespült wurde, wurden auch Filter und Spülflüssigkeit gekühlt. Dabei wurden $6\text{-}8 \times 10^8$ Leukozyten

gewonnen (100). Meyer et al. arbeiteten bei Raumtemperatur; Wegehaupt et al. machen keine Temperaturangaben (50,57). Es wäre also denkbar, dass die Leukozytenausbeute bei kalten Temperaturen erhöht werden könnte. Dies wäre jedoch vor allem für die einfache Rückspülung oder die Thrombozytenreduktion relevant, da die Accutase mindestens Raumtemperatur benötigt. Die ideale Wirkung von Trypsin liegt bei 37°C (86–88). Valizadeh et al. beschreiben, dass sie nach der Spülung mit PBS bei 34-37°C nochmals mit eiskalter Flüssigkeit spülten, um insbesondere Monozyten aus dem Filter zu lösen (55). Meer et al. beschreiben, dass die Filtrationseffektivität einiger Polyester-Filter bei Raumtemperatur geringer ist als bei 4°C (132). Dies würde bedeuten, dass die Rückspülung bei Raumtemperatur effektiver sein müsste. Dagegen spricht die Arbeit von Shukla et al. (58). Diese Arbeitsgruppe testete verschiedene Spüllösungen bei verschiedenen Temperaturen. Dabei konnten sie keinen Einfluss auf die Leukozytenausbeute durch die Temperatur oder die Zusammensetzung der Spülflüssigkeit feststellen. Auch Sasani et al. konnten keine signifikante Änderung der Leukozytenausbeute bei verschiedenen Temperaturen feststellen (131). Die Literatur zeigt also widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der optimalen Temperatur. Trotzdem wäre es für die zukünftige Forschung sinnvoll, die Filter dieser Arbeit nochmals bei verschiedenen Temperaturen zu testen.

Ein weiterer wichtiger Unterschied im Vergleich zu anderen Arbeiten sind die verwendeten Filter. In anderen Arbeiten wurden beispielsweise der Leukotrap Filter von Cutter Biological (56), der Leukoflex LST-1 von Macopharma (50,51), der LCR-5 von Macopharma (54,55,131), der Compoflex T3908 von Fresenius Hemocare (50), der WBF2 oder WBF 3 der Firma Pall-Gelman (52,53), der RCM1 Leukocyte Reduction Filter (PALL, Birmingham, USA) (133) sowie der Terumo LR Express Filter genutzt (57). Die hier untersuchten Imugard® III RC-Filter von Terumo BCT und DONOpack-Filter von Lmb Technologie wurden in der Literatur noch nicht untersucht. Der Vorteil dieser Filter ist vor allem die harte Schale, die sich während der Filtration oder des Spülvorgangs nicht ausdehnt. Jedoch ist es möglich, dass die bereits beschriebenen Unterschiede in der Leukozytenausbeute auch durch die verwendeten Filter entstanden sind. Die in Kapitel 1.2.3 beschriebenen Mechanismen werden durch den Aufbau und das Material eines Filters bestimmt. So kann der Filtrationsvorgang durch die Wahl des Filters verändert werden (19,31,32,41). Das bedeutet, dass dadurch auch die Lösung der adhärenen Leukozyten vereinfacht oder erschwert sein könnte. Leider ist über die genaue Konfiguration einzelner Filter wenig bekannt, sodass kein finaler Rückschluss von der Leukozytenausbeute auf die Vorteile einzelner Materialien oder Filterkonfigurationen gezogen werden kann.

Eine Alternative zu den hier genutzten Depletionsfiltern stellen Filter zur Herstellung von Thrombozytenkonzentraten dar. Eine Methode zur Präparation dieser Konzentrate ist das Pooling von Buffy Coats. Meist werden vier bis sechs AB0-kompatible Buffy Coats in einem sterilen Beutelsystem zusammengeführt, mit Plasma oder Additivlösung versetzt, zentrifugiert und über einen geeigneten Filter gegeben. Auf diese Weise kann die Leukozytenzahl eines Thrombozytenkonzentrats auf weniger als 1×10^6 reduziert werden (19,22,134). In dieser Arbeit wurden Vollblutfilter verwendet, die zur Herstellung eines leukozytenfreien Erythrozytenkonzentrats geeignet sind. Vorteil der Pooling-Methode gegenüber den hier genutzten Vollblutfiltern wäre, dass mehrere Buffy Coats über einen Filter gegeben werden können. Dementsprechend wäre die Ausgangszellzahl in den gefüllten Filtern höher, sodass möglicherweise eine höhere Leukozytenausbeute bei Rückspülung ebendieser Filter zu erwarten wäre.

Die Zusammensetzung des Buffy Coats könnte zudem einen Einfluss auf den Filtrationseffekt und damit indirekt auf die Ausbeute bei Filtrerrückspülung haben. Laut Bruil et al. beeinflusst Plasma die Leukozytenadhäsion, indem diese in Anwesenheit von Plasma vermindert wird (31,42). Ein Buffy Coat enthält nur noch wenig Plasma, was die Adhäsion wiederum verstärken könnte. Es wäre also denkbar, dass die Leukozyten stärker am Filtermaterial haften aufgrund des fehlenden Plasmas im Buffy Coat. Dadurch könnten diese bei der Rückspülung vermehrt am Material adhäriert bleiben als die Zellen eines plasmareichen Vollblutpräparats. Das bedeutet, dass die Ausbeute größer sein könnte, wenn Vollblut gefiltert würde. In anderen Arbeiten, bei denen eine höhere Ausbeute erreicht wurde, wurde meist Vollblut gefiltert (50,57,58). Longley et al. entfernten ebenfalls das Zellplasma und erreichten eine vergleichsweise geringe Leukozytenausbeute (56).

Ein weiterer Faktor, der durch die Entfernung des Plasmas beeinflusst wird, ist der Calcium-Gehalt des Blutprodukts. Es ist bekannt, dass Calcium die Adhäsion von Leukozyten beeinflusst (31,43,135). Die verwendeten Buffy Coats waren mit Citrat antikoaguliert, wodurch diese calciumfrei waren. Henschler et al. stellten fest, dass bei Filtration ohne Calcium vor allem Thrombozyten, Monozyten und Lymphozyten um Bindungsstellen am Filtermaterial konkurrieren, Granulozyten jedoch nicht (43). Wenn Calcium vorhanden ist, werden eher Granulozyten gebunden (18). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass vermutlich die Abwesenheit von Calcium die Bindung von Thrombozyten an Monozyten über P-Selektin fördert (41,136). P-Selektin muss jedoch erst durch eine Thrombozytenaktivierung exprimiert werden (137). Diese Bindung ist calciumabhängig (138). Da bei Rückspülung des DONOPack-Filters bei der mikroskopischen Betrachtung festgestellt wurde, dass anteilig mehr

Granulozyten als im Ausgangs-Buffy Coat enthalten waren, wäre es möglich, dass die Oberfläche des Filterinneren zu einer Aktivierung der Thrombozyten und daraus resultierender P-Selektin-Expression führt. Im Zusammenspiel mit dem Calciummangel können Granulozyten möglicherweise nicht mehr gut gebunden werden und können dementsprechend leichter herausgespült werden.

Dass Thrombozyten an Granulozyten binden und damit die Filtration ebendieser beeinflussen könnten, ist lange bekannt (139). Aus diesem Grund wurde für die vorliegende Arbeit der Versuch durchgeführt, Leukozyten nach Filtration eines thrombozytenreduzierten Blutprodukts zu gewinnen. Die Ergebnisse können die Interaktion von Thrombozyten und Granulozyten bestätigen, denn in diesem Fall sind auch beim Terumo-Filter in der Rückspülung anteilig mehr Granulozyten zu finden als im Ausgangs-Buffy Coat. Dabei konnte eine statistisch signifikante Steigerung der Leukozytenausbeute bei Rückspülung des Terumo-Filters im Vergleich zur einfachen Rückspülung erreicht werden, als der thrombozytenreiche Überstand mit 0,9% NaCl ersetzt wurde. Insgesamt konnte ebenfalls bei beiden Filtern die Ausbeute durch die Thrombozytenreduktion im Vergleich zur einfachen Rückspülung statistisch signifikant gesteigert werden ($p < 0,05$). Dies könnte also einerseits die These unterstreichen, dass Thrombozyten die Adhäsion von Leukozyten erhöhen (31,42,43). Andererseits könnte es aber auch der These widersprechen, dass Leukozyten bei Abwesenheit von Plasma schlechter an das Filtermaterial adhären, denn bei diesem Versuch wurde noch mehr Plasma entfernt als bei einem unverarbeiteten Buffy Coat. Trotzdem ist die Steigerung der Leukozytenausbeute signifikant. Für die stärkere Bindung der Leukozyten in Anwesenheit von Thrombozyten spricht auch, dass bei Filtration über einen DONOPack-Filter bei Spülung in Flussrichtung Leukozyten gewonnen werden konnten als ein thrombozytenreduzierter Buffy Coat genutzt wurde. Jedoch würde das bedeuten, dass bei Thrombozytenreduktion des Blutprodukts die vollständige Leukozytendepletion durch den Filter nicht gewährleistet werden kann. Damit wäre der Filter in diesem Fall ungeeignet für die Anwendung am Patienten, zum Beispiel im Rahmen von kardiopulmonalen Operationen, für Autotransfusionen von Tumorpatienten oder im ARTICE®-Verfahren, da der Patient mit Spenderzellen oder Tumorzellen in Kontakt kommen könnte (140–143).

Wie zuvor bereits beschrieben, ist die Leukozytenvitalität, die in dieser Arbeit festgestellt wurde, vergleichbar mit derjenigen anderer Arbeiten (50,52,54,56,57,100). Dabei ist allerdings zu beachten, dass die Vitalität in der Regel mit anderen Methoden bestimmt wurde, zum Beispiel mit der Trypanblau-Methode. Diese Methode ist weit verbreitet. Der Farbstoff kann in tote Zellen eindringen, in vitale Zellen jedoch nicht. Wenn die Färbung erfolgt ist, kann eine

mikroskopische Differenzierung anhand der Zellfarbe erfolgen, zum Beispiel mittels Hämozytometer (144). Eine weitere Möglichkeit ist die Messung mittels Durchflusszytometrie. Diese basiert auf dem Effekt, dass fluoreszierendes Propidiumiodid (PI) nicht in die Zellmembran von intakten Zellen eindringen kann. Das Durchflusszytometer kann dann Zellen mit und ohne Fluoreszenz unterscheiden und diesen Unterschied messen (145,146). Die Vitalitätsmessung mittels NucleoCounter[®] NC-200[™] basiert ebenfalls auf einer unterschiedlichen Färbung von vitalen und nicht-vitalen Zellen mit AO und DAPI (vergleiche Kapitel 3.3.2) und der dadurch veränderten Fluoreszenz (91–93). Vorteil dieser Methode im Vergleich zur Trypanblau-Methode ist, dass sie automatisiert durchgeführt wird. Trypanblau wirkt außerdem zytotoxisch. Daher kann es bei zu langer Inkubationszeit zu einer Zunahme des Anteils an toten Zellen kommen (144,147). Weiterhin ist diese Methode aufwendig und untersucherabhängig (145,148). Die Messung mittels NucleoCounter[®] dagegen ist objektiv und schnell durchzuführen und stellt somit eine gute Alternative zur Vitalitätsmessung dar (92,149). Ein weiterer wichtiger Punkt, der bei der Bewertung der Ergebnisse beachtet werden sollte, ist, dass sich die Phagozytose-Fähigkeit sowie die Fähigkeit zum oxidativen Burst des Buffy Coats unterscheiden. Die möglichen Ursachen dafür sind vielfältig. Die Bedingungen waren vor der Verarbeitung gleich: Bis zur Verarbeitung wurde der Buffy Coat bei Raumtemperatur und lichtgeschützt unbewegt gelagert. Faktoren wie Alter oder Lebensstil des Spenders können die Funktionalität von Leukozyten jedoch beeinflussen (150,151). Allerdings lagen keine Informationen zu den Spendern vor, sodass keine Rückschlüsse auf die Leukozytenfunktionalität gezogen werden konnten. In humanen Blutproben können immer große Schwankungen hinsichtlich der Zellzahlen auftreten. Um diese Schwankungen auszugleichen, kann eine größere Stichprobengröße berücksichtigt werden. Aus diesem Grund wurden die Fähigkeiten zur Phagozytose und zum oxidativen Burst aus allen Messungen gemittelt, um die großen individuellen Schwankungen zu reduzieren.

Weiterhin ist der verwendete Assay für die Phagozytose- und oxidative Burst-Aktivität für heparinisiertes Vollblut ausgelegt (97,98). In dieser Arbeit wurden mit Citrat antikoagulierte Buffy Coats verwendet, die weniger Plasma und Erythrozyten enthielten als Vollblut, sodass eine Adaption des üblichen Assays auf diese Situation erfolgte. Die Proben wurden mit einer Calcium-Heparin-Lösung versetzt. Trotzdem enthielten die getesteten Buffy Coats bzw. die gewonnenen Rückspülungen weniger Plasma und Erythrozyten als Vollblut. Die Arbeitsanweisung des Herstellers für den Assay gibt an, dass die enthaltenen Erythrozyten mittels einer Lyse-Lösung entfernt werden sollen (97,99). Da in den hier verwendeten Proben

weniger Erythrozyten enthalten waren, ist es möglich, dass andere zelluläre Bestandteile mehr durch die zytotoxische Lyse beeinflusst wurden.

Eine weitere technische Besonderheit, die hier diskutiert werden soll, ist die Messung mit dem Sysmex KX-21N. In einigen Versuchen konnte eine Zunahme der Leukozytenzahl beobachtet werden (vergleiche Tab. 20), obwohl keine weiteren Zellen hinzugegeben wurden. Dieses Phänomen wurde auch in anderen Versuchen des gleichen Labors beobachtet. Es wird ein Zusammenhang mit der Messtechnik des Geräts vermutet. Wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, misst das Gerät die Zellen unter anderem anhand ihrer Größe (89). Möglich wäre, dass zum Beispiel Thrombozyten durch die Verarbeitung anschwellen und dadurch als Leukozyten gemessen werden. Wenn durch die Inkubation mit Accutase die Permeabilität der Zellmembran verändert wird, kann dies zu einem nekrotischen Zelltod führen, welcher mit einer Zellschwellung einhergeht (152). Da die Leukozyten durch die Erythrozyten-Lyse schrumpfen, wäre eventuell bereits ein geringer Anstieg des Zellvolumens der Thrombozyten ausreichend, um diese als Leukozyten zu werten. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in einer anderen Arbeit beschrieben, in der Zellzahlmessungen durchgeführt wurden. Die Arbeitsgruppe beobachtete eine Zunahme der Leukozytenzahl nach der Kühlung von Proben. Diese Zunahme führten sie ebenfalls auf die fälschliche Messung von Thrombozyten als Leukozyten durch das Zellmessgerät zurück (132). Weiterhin kann das Gerät bei Verdünnung der Blutprobe nicht mehr zwischen einzelnen Leukozytenpopulationen differenzieren. Aus diesem Grund wurde die Auszählung der Zellen in den Spülungen unter dem Mikroskop durchgeführt. Diese ist jedoch untersucherabhängig. Aufgrund der fehlenden Differenzierungsfähigkeit des Sysmex KX-21N bei starker Verdünnung war es daher nicht möglich, die ausgezählte Zellzahl durch das Gerät verifizieren zu lassen.

Die statistische Signifikanz konnte für die jeweiligen Methoden als Gesamtes, also über alle Inkubationszeiten hinweg, nachgewiesen werden: Die Inkubation mit Accutase steigert bei beiden Filtern die Ausbeute signifikant. Die Inkubation mit Trypsin steigert diese nur beim DONOpack-Filter signifikant. Die Thrombozytenreduktion steigert die Ausbeute bei beiden Filtern. Die fehlende statistische Signifikanz für die einzelnen Inkubationszeiten kann wahrscheinlich auf die geringe Stichprobengröße zurückgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde jeder Versuch so durchgeführt, dass jeweils drei Ansätze pro Versuch getestet wurden. Begründet war dies vor allem darin, dass der eigentliche Bedarf an Buffy Coats nicht durch die verfügbaren Blutspenden gedeckt werden konnte. Die kleine Stichprobengröße führte dazu, dass die Auswertung durch die statistischen Methoden nur eingeschränkt möglich war. Die deskriptive Statistik zeigt in vielen Fällen, wie bei den durchflusszytometrischen Tests nach

Inkubation mit Trypsin und Accutase, dass eine Abnahme der Funktionsfähigkeit der Zellen stattfindet. Durch die kleine Stichprobengröße wird jedoch im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test und Mann-Whitney-U-Test keine statistische Signifikanz für einzelne Inkubationszeiten festgestellt. Aufgrund der kleinen Stichprobengröße wurde der Median zur Angabe des Mittels genutzt. Dadurch kommt es dazu, dass die prozentuale Verteilung der Populationen in einem Buffy Coat in Summe mehr als 100% ergibt (Tab. 1). Aus demselben Grund entspricht die Gesamtausbeute, wie beispielsweise in Tab. 7, zum Teil nicht der Summe aus den einzelnen Spülschritten. Weiterhin konnte durch die begrenzte Stichprobengröße keine Normalverteilung angenommen werden. Würde der Stichprobenumfang vergrößert, könnte sich dies möglicherweise ändern. Da Blutspenden in der Regel jedoch für die Therapie und nicht für die Forschung verwendet werden, ist ihre Verfügbarkeit begrenzt.

5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich aus den aufgeführten Gründen schließen, dass die verwendeten Methoden nicht dafür geeignet sind, große Zellmengen zu generieren, zum Beispiel für ein Granulozytenkonzentrat. Für die Verwendung zu Forschungs- oder Therapiezwecken mit geringerer Leukozytenkonzentration wäre die einfache Rückspülung die geeignete Methode, da die gewonnenen Leukozyten vital und funktionsfähig sind. Die Leukozyten, die mit Accutase inkubiert wurden, sind zwar vital, jedoch nicht funktionsfähig und daher nur begrenzt geeignet. Die Zellen, die mit Trypsin behandelt wurden, sind nicht geeignet, da diese in ihrer Vitalität und Funktionalität reduziert werden. Die Technik der vorhergehenden Thrombozytenreduktion des Buffy Coats könnte eine geeignete Methode darstellen, jedoch müssten weitere Untersuchungen erfolgen. Dazu gehören die Analyse der Vitalität und die Bestimmung der Fähigkeiten zur Phagozytose und zum oxidativen Burst vor und nach der Thrombozytenreduktion.

Mögliche Ansatzpunkte, um die hier vorgestellte Methodik zu verbessern, wären die Änderung der Zusammensetzung der Spüllösung und die Änderung der Temperatur. Der DONOpack-Filter sowie der Imugard® III RC-Filter könnten mit PBS sowie mit Zusätzen, zum Beispiel EDTA, Saccharose oder Dextran und Albumin, getestet werden. Außerdem wäre es interessant, die einfache Rückspülung bei verschiedenen Temperaturen, insbesondere bei niedrigen Temperaturen, durchzuführen. Dabei müssen weitere Messungen zur Vitalität und Funktionalität erfolgen, um den Einfluss der Temperatur oder der Additive auf diese Parameter zu überprüfen. Nur dann kann beurteilt werden, ob die gewonnenen Zellen für die hier genannten Ziele geeignet sind und ausreichend Zellmaterial zur Verfügung steht.

Eine weitere Methode zur Optimierung des Rückspülungsprozesses könnte die Differenzierung der gewonnenen Leukozyten sein. Da in der Forschung und in der Therapie häufig mononukleäre Zellen gefragt sind, zum Beispiel für die Immuntherapie, könnte eine Analyse der gewonnenen Zellen hinsichtlich ihrer Population und ihrer Oberflächenantigene sinnvoll sein.

Weiterhin könnte diese Arbeit eine Grundlage bilden, um den Einfluss von Accutase auf die Leukozytenfunktionalität in Hinblick auf die Fähigkeiten zur Phagozytose und zum oxidativen Burst zu untersuchen, da dies in der bisherigen Forschung kaum geschehen ist. Weitere Untersuchungen sind sinnvoll, insbesondere um zu klären, warum die Filtration und die nachfolgende Accutase-Inkubation einen größeren Einfluss auf die Funktionalität hat als die reine Accutase-Inkubation.

Die aktuelle Methodik ist nicht ausreichend geeignet, um Granulozytenkonzentrate für das ARTICE[®]-System herzustellen. Eine mögliche technische Alternative könnte sein, die Plasmafilter im ARTICE[®]-System durch gefüllte Leukozytendepletionsfilter zu ersetzen und das Plasma des Patienten dort mit den Zellen in Kontakt zu bringen. Hierfür würde sprechen, dass bei Spülung in Flussrichtung alle Leukozyten zurückgehalten werden können, sofern der Buffy Coat nicht zuvor thrombozytenreduziert wurde. Allerdings müsste dafür eine Methode etabliert werden, um die Vitalität und Funktionalität der Zellen noch im Filter zu testen.

6 Zusammenfassung

Leukozyten werden heutzutage für viele verschiedene Forschungs- und Therapieziele benötigt, jedoch können herkömmliche Methoden zur Leukozytengewinnung den Bedarf nicht decken. Leukozytendepletionsfilter stellen dabei eine potenziell effektive und aufwands- und kostengünstige Methode zur Leukozytengewinnung dar. In dieser Arbeit wurden Imugard® III RC-Filter von Terumo BCT sowie DONOpac-Filter von Lmb Technologie untersucht. Dabei wurden die Filter entgegen ihrer Flussrichtung nach Filtration eines Buffy Coats mit einer Spritze mit 0,9% NaCl oder PBS gespült. Es wurde zum einen die einfache Rückspülung bewertet, zum anderen wurde die Ausbeute nach Inkubation mit Trypsin oder Accutase untersucht. Außerdem wurde der Buffy Coat vor der Filtration in der Thrombozytenzahl durch Zentrifugation und Abnahme des Überstands reduziert. Die gewonnenen Leukozyten wurden bezüglich der Anzahl, Vitalität, Funktionalität und Morphologie beurteilt. Zudem wurden die Reaktionen von Buffy Coats auf Accutase und Trypsin ohne Filtration getestet. Die Untersuchungen ergaben, dass eine große Ausbeute mittels Accutase-Inkubation erreicht werden konnte: Es konnten $3,11 \times 10^8$ Leukozyten aus dem Terumo-Filter und $2,78 \times 10^8$ aus dem DONOpac-Filter gewonnen werden. Dies ging jedoch mit einem Verlust der Phagozytose-Fähigkeit von 68-85% und der Fähigkeit zum oxidativen Burst von 67-70% einher. Die Vitalität blieb mit mindestens 88% erhalten. Durch die einfache Rückspülung können vitale (über 90%) und funktionsfähige Leukozyten gewonnen werden, allerdings in reduzierter Menge. Trypsin ist für die Anwendung der Ablösung der Zellen aus dem Filter nicht geeignet, während die Auswirkung der Thrombozytenreduktion weiterer Untersuchungen bedarf. Prinzipiell ist die hier vorgestellte Methode eine Möglichkeit zur Leukozytengewinnung, bis zur vollen Anwendbarkeit besteht jedoch noch Verbesserungsbedarf. Die Veränderung der Spülflüssigkeit (Zusätze wie EDTA, Saccharose) oder die Veränderung der Temperatur während des Rückspülprozesses (4°C) könnten dafür mögliche Ansatzpunkte sein. Durch Testung der Immunzellen innerhalb der Filter könnte die Verwendbarkeit für Therapieansätze ohne Herauslösen aus dem Filter beurteilt werden.

7 Thesen

- I. Leukozyten stellen ein geeignetes Zellmodell für die wissenschaftliche Forschung und klinische Anwendung dar. Jedoch kann der Bedarf an Leukozyten nicht mit herkömmlichen Blutprodukten gedeckt werden, weshalb es erforderlich ist, eine alternative Leukozytenquelle zu finden.
- II. Leukozytendepletionsfilter werden in der Transfusionsmedizin angewendet, um Blutprodukte in ihrer Leukozytenzahl zu reduzieren. Ziel dabei ist, das Auftreten unerwünschter transfusionsassoziierter Erkrankungen zu vermindern. Da Leukozytendepletionsfilter als Abfallprodukte auftreten, können sie eine potenzielle Leukozytenquelle zur Anwendung in Therapie und Forschung darstellen.
- III. Durch die Rückspülung eines DONOpac-Filters von Lmb Technologie mit 0,9% NaCl nach Filtration eines Buffy Coats können vitale und funktionsfähige Zellen gewonnen werden.
- IV. Durch die Rückspülung eines Imugard® III RC-Filters von Terumo BCT mit 0,9% NaCl nach Filtration eines Buffy Coats können vitale und funktionsfähige Zellen gewonnen werden.
- V. Da die Leukozyten, die durch die einfache Rückspülung gewonnen werden können, vital und funktionsfähig sind, können sie in der Forschung Anwendung finden. Der Bedarf an Leukozyten in der klinischen Anwendung, zum Beispiel für das ARTICE®-Verfahren, kann durch diese Methode aufgrund der geringen Ausbeute nicht gedeckt werden.
- VI. Die Inkubation eines Imugard® III RC-Filters (Terumo BCT) oder eines DONOpac-Filters (Lmb Technologie) mit Trypsin steigert die Leukozytenausbeute im Vergleich zur einfachen Rückspülung.
- VII. Der Wirkmechanismus von Trypsin hat einen deutlichen Einfluss auf die Vitalität, Funktionalität und Morphologie von ungefilterten und gefilterten Leukozyten. Aus diesem Grund ist Trypsin nicht zur Gewinnung vitaler und funktionsfähiger Leukozyten geeignet.
- VIII. Die Inkubation eines Imugard® III RC-Filters (Terumo BCT) oder eines DONOpac-Filters (Lmb Technologie) mit Accutase steigert die Leukozytenausbeute im Vergleich zur einfachen Rückspülung. Die Effizienz ist höher als die von Trypsin.
- IX. Accutase zeigt gegenüber Trypsin eine schonendere Dissoziation von Zellen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass Accutase die Funktionalität

der Leukozyten beeinträchtigt, aber die Vitalität intakt bleibt. Aus diesem Grund ist Accutase zur Leukozytengewinnung nur bedingt geeignet.

- X. Die Thrombozytenreduktion des Buffy Coats vor der Filtration über einen Imugard® III RC-Filter (Terumo BCT) oder einen DONOpack-Filter (Lmb Technologie) steigert die Leukozytenausbeute im Vergleich zur einfachen Rückspülung.
- XI. Wenn ein Buffy Coat vor der Filtration in seiner Thrombozytenzahl reduziert wird, zeigen die Leukozyten bereits durch den Verarbeitungsprozess des Buffy Coats morphologische Auffälligkeiten. Daher sind weitere Untersuchungen zur Beurteilung der Eignung dieser Methode notwendig.

8 Literaturverzeichnis

1. Bröker B, Schütt C, Fleischer B. Grundwissen Immunologie. 4. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2019. S. 4-6, 15, 78-79, 125, 192-195.
2. Peter H-H, Pichler W, Müller-Ladner U, Herausgeber. Klinische Immunologie. 3. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2012. S. 3–5.
3. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL, Baker A. Cellular and molecular immunology. 9. Aufl. Philadelphia, USA: Elsevier; 2018. S. 3.
4. Chaplin DD. Overview of the immune response. J Allergy Clin Immunol. Februar 2010;125(2):3–23.
5. Murphy K, Weaver C. Janeway Immunologie. 9. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2018. S. 48-49, 97-103.
6. Martin M, Martin MU, Resch K. UTB basics - Immunologie: 101 Abbildungen, 26 Tabellen. Stuttgart: Ulmer; 2009. S. 8-9.
7. Suerbaum S, Burchard GD, Kaufmann SHE, Schulz TF, Hahn H, Falke D, u. a., Herausgeber. Springer Lehrbuch - Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 9. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2020. S. 57-61, 127.
8. Melchers F. Von der Stammzelle zum Lymphozyten. Z Für Rheumatol. Mai 2009;68(3):196–204.
9. Wu SY, Fu T, Jiang YZ, Shao ZM. Natural killer cells in cancer biology and therapy. Mol Cancer. Dezember 2020;19(1):120.
10. Klion AD, Ackerman SJ, Bochner BS. Contributions of Eosinophils to Human Health and Disease. Annu Rev Pathol Mech Dis. Januar 2020;15(1):179–209.
11. Biedermann T, Heppt W, Renz H, Röcken M, Herausgeber. Allergologie. 2. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2016. S. 69-83.
12. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Taschenlehrbuch Histologie. 6. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2019. S. 330-343.
13. Wintermantel E, Ha SW, Herausgeber. Medizintechnik: Life Science Engineering; Interdisziplinarität, Biokompatibilität, Technologien, Implantate, Diagnostik, Werkstoffe, Zertifizierung, Business. 5. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2009. S. 181.
14. Gardner A, de Mingo Pulido Á, Ruffell B. Dendritic Cells and Their Role in Immunotherapy. Front Immunol. Mai 2020;11:924.
15. Ferenčík M, Rovenský J, Mat'ha V, Herold M. Kompendium der Immunologie: Grundlagen und Klinik. Vienna: Springer; 2006. S. 49-51.

16. Chen Y, Junger WG. Measurement of oxidative burst in neutrophils. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2012;844:115–24.
17. Bianchi M, Vaglio S, Pupella S, Marano G, Facco G, Liumbruno GM, u. a. Leucoreduction of blood components: an effective way to increase blood safety? *Blood Transfus*. Mai 2016;14(2):214–27.
18. Dzik WH. Leukoreduction of blood components: *Curr Opin Hematol*. November 2002;9(6):521–6.
19. Sachs UJH, Bux J. Gewinnung, Herstellung und Lagerung von Blut und Blutkomponenten. In: Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, Herausgeber. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen – Therapie – Methodik*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2011. S. 229–31, 233–4.
20. Pschyrembel W, Herausgeber. *Pschyrembel: Klinisches Wörterbuch*. 268. Aufl. Boston: De Gruyter; 2020. S. 23, 1011.
21. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM). Guide for the preparation, use and quality assurance of blood components: Recommendation No. R (95) 15. Straßburg, Frankreich; 2020. S. 203.
22. Paul-Ehrlich-Institut, Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel. Bundesanzeiger: Bekanntmachung der Richtlinie zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Richtlinie Hämotherapie) gemäß den §§ 12a und 18 des Transfusionsgesetzes. In 2017.
23. Lefèvre H, Walther-Wenke G, Burkhard J. Leukozytendepletion. In: *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. Berlin, Heidelberg: Springer; 1999. S. 121–31.
24. Bassuni WY, Blajchman MA, Al-Moshary MA. Why implement universal leukoreduction? *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. April 2008;1(2):106–23.
25. Blajchman MA. The Clinical Benefits of the Leukoreduction of Blood Products. *J Trauma Inj Infect Crit Care*. Juni 2006;60(6):83–90.
26. Pietersz RNI, Steneker I, Reesink HW. Prestorage Leukocyte Depletion of Blood Products in a Closed System. *Transfus Med Rev*. Januar 1993;7(1):17–24.
27. Hervig T, Seghatchian J. Leukocyte-reduced blood components: laboratory and clinical aspects. In: Simon TL, McCullough J, Snyder EL, Solheim BG, Trauss RGS, Herausgeber. *Rossi's Principles of Transfusion Medicine*. Chichester, England: John Wiley & Sons, Ltd.; 2016. S. 278–85.
28. Pertinhez TA, Casali E, Baroni F, Berni P, Baricchi R, Spisni A. A Comparative Study

of the Effect of Leukoreduction and Pre-storage Leukodepletion on Red Blood Cells during Storage. *Front Mol Biosci.* April 2016;3(13).

29. Pedal I, Leo A. Diagnose akuter Transfusionsreaktionen. *Rechtsmedizin.* Dezember 2006;16(6):414–25.
30. Suck G, Brixner V, Müller MM, Zeiler T. Herstellung von Blutkomponenten aus Vollblutspenden aus der Perspektive großer Blutspendedienste. *hämotherapie.* 2019;33.
31. Bruil A, Beugeling T, Feijen J, van Aken WG. The mechanisms of leukocyte removal by filtration. *Transfus Med Rev.* April 1995;9(2):145–66.
32. Singh S, Kumar A. Leukocyte depletion for safe blood transfusion. *Biotechnol J.* August 2009;4(8):1140–51.
33. Neumeister B. Transfusionsmedizin. In: Neumeister B, Böhm BO, Herausgeber. *Klinikleitfaden Labordiagnostik.* 6. Aufl. Munich: Urban & Fischer; 2018. S. 540.
34. Wenz B. Leukocyte-Poor Blood. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci.* Januar 1986;24(1):1–20.
35. Robert-Koch-Institut. Parameter des roten Blutbildes bei Exposition durch Mobilfunkanlagen: Mitteilung der Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz.* August 2006;49(8):833–5.
36. Kumar H, Gupta P, Mishra D, Sarkar R, Jaiprakash M. Leucodepletion and Blood Products. *Med J Armed Forces India.* April 2006;62(2):174–7.
37. Meryman H, Hornblower M. The preparation of red cells depleted of leukocytes. Review and evaluation. *Transfusion (Paris).* Januar 1986;26(1):101–6.
38. Siddon AJ, Tormey CA, Snyder EL. Platelet Transfusion Medicine. In: *Platelets.* Elsevier; 2019. S. 1144.
39. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* September 2007;7(9):678–89.
40. Johnston B, Butcher EC. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Semin Immunol.* April 2002;14(2):83–92.
41. Dzik S. Leukodepletion Blood Filters: Filter Design and Mechanisms of Leukocyte Removal. *Transfus Med Rev.* April 1993;7(2):65–77.
42. Bruil A, Sheppard JI, Feijen J, Feuerstein IA. In vitro leukocyte adhesion to modified polyurethane surfaces: III. Effect of flow, fluid medium, and platelets on PMN adhesion. *J Biomater Sci Polym Ed.* Januar 1994;5(4):263–77.
43. Henschler R, Ruster B, Steimle A, Hansmann HL, Walker W, Montag T, u. a. Analysis of leukocyte binding to depletion filters: role of passive binding, interaction with platelets, and

plasma components. *Ann Hematol.* August 2005;84(8):538–44.

44. Bruil A, Van Aken WG, Beugeling T, Feijen J, Steneker I, Huisman JG, u. a. Asymmetric membrane filters for the removal of leukocytes from blood. *J Biomed Mater Res.* Dezember 1991;25(12):1459–80.

45. Robert-Koch-Institut. Stellungnahme des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit. 1999;(49):89–92.

46. Paul-Ehrlich-Institut, Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel. Bundesanzeiger: Bekanntmachung der Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Richtlinie Hämotherapie) gemäß §§ 12 und 18 des Transfusionsgesetzes (TFG). In 2010.

47. Ferdowsi S, Abbasi-Malati Z, Pourfathollah AA. Leukocyte reduction filters as an alternative source of peripheral blood leukocytes for research. *Hematol Transfus Cell Ther.* Oktober 2021;43(4):494–8.

48. Peytour Y, Villacreces A, Chevaleyre J, Ivanovic Z, Praloran V. Discarded leukoreduction filters: A new source of stem cells for research, cell engineering and therapy? *Stem Cell Res.* September 2013;11(2):736–42.

49. Peytour Y, Guitart A, Villacreces A, Chevaleyre J, Lacombe F, Ivanovic Z, u. a. Obtaining of CD34+ cells from healthy blood donors: development of a rapid and efficient procedure using leukoreduction filters. *Transfusion (Paris).* Oktober 2010;50(10):2152–7.

50. Meyer TPH, Zehnter I, Hofmann B, Zaisserer J, Burkhart J, Rapp S, u. a. Filter Buffy Coats (FBC): A source of peripheral blood leukocytes recovered from leukocyte depletion filters. *J Immunol Methods.* Dezember 2005;307(1–2):150–66.

51. Ferdowsi S., Pourfathollah AA. Leukocyte reduction filters: A source of peripheral blood leukocytes for research and drug production. *Glob J Transfus Med.* April 2019;4:122–3.

52. Izquierdo N., Naranjo M., Fernández M.A., Cos J., Massuet L., Martínez-Picado J., u. a. Leukocyte Reduction Filters: an alternative source of Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Immunología.* September 2003;Vol. 22(3):255–62.

53. Ebner S, Neyer S, Hofer S, Nussbaumer W, Romani N, Heufler C. Generation of large numbers of human dendritic cells from whole blood passaged through leukocyte removal filters: an alternative to standard buffy coats. *J Immunol Methods.* Juni 2001;252(1–2):93–104.

54. Dezfouli AB, Pourfathollah AA, Nikougofar-Zarif M, Khosravi M, Tajrishi M, Ezzati N, u. a. Optimizing the recovery of peripheral blood mononuclear cells trapped in leukoreduction filters - A comparison study. *Hematol Transfus Cell Ther.* Dezember 2020;(50):2152–7.

55. Valizadeh M, Purfathollah AA, Raoofian R, Homayoonfar A, Moazzeni M. Optimized simple and affordable procedure for differentiation of monocyte-derived dendritic cells from LRF: An accessible and valid alternative biological source. *Exp Cell Res*. September 2021;406(2):112754.
56. Longley RE, Stewart D. Recovery of functional human lymphocytes from Leukotrap filters. *J Immunol Methods*. Juli 1989;121(1):33–8.
57. Wegehaupt AK, Roufs EK, Hewitt CR, Killian ML, Gorbatenko O, Anderson CM, u. a. Recovery and assessment of leukocytes from LR Express filters. *Biologicals*. September 2017;49:15–22.
58. Shukla GS, Pero SC, Mei L, Hitchcox S, Fung M, Sprague J, u. a. Preparation of clinical-grade WBCs using leukocyte reduction filters. *J Immunol Methods*. Dezember 2021;499:113157.
59. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, u. a. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 23. Februar 2016;315(8):801.
60. Fleischmann-Struzek C, Schwarzkopf D, Reinhart K. Inzidenz der Sepsis in Deutschland und weltweit: Aktueller Wissensstand und Limitationen der Erhebung in Abrechnungsdaten. *Med Klin - Intensivmed Notfallmedizin*. Mai 2022;117(4):264–8.
61. David S, Brunkhorst FM. Sepsis-3: Was ist gesichert in der Therapie? *Internist*. Dezember 2017;58(12):1265.
62. Sedlacek HH. Multiples Organversagen: Ursachen, Diagnostik, Behandlungsstrategien und Prävention. Berlin, Boston: De Gruyter; 2018. S. 285.
63. Richter D, Heininger A, Schmidt K, Schmoch T, Bernhard M, Mayer P, u. a. Diagnostik der Sepsis – Teil 1: allgemeine Diagnostik und Fokussuche-/sanierung. *AINS - Anästhesiol · Intensivmed · Notfallmedizin · Schmerzther*. Januar 2019;54(01):22–36.
64. Richter D, Heininger A, Schmidt K, Schmoch T, Bernhard M, Mayer P, u. a. Diagnostik der Sepsis – Teil 2: Erregeridentifikation. *AINS - Anästhesiol · Intensivmed · Notfallmedizin · Schmerzther*. Januar 2019;54(01):38–48.
65. Brunkhorst FM, Weigand M, Pletz M, Gastmeier P, Lemmen SW, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weyland A, Marx G, Bucher M, Gerlach H, Salzberger B, Grabein B, Welte T, Werdan K, Kluge S, Bone HG, Putensen Ch, Rossaint R, Quintel M, Spies C, Weiß B, John S, Oppert M, Jörres A, Brenner T, Elke G, Gründling M, Mayer K, Weimann A, Felbinger TW, Axer H, Deutsche Sepsis Gesellschaft e. V. (federführend). S3-Leitlinie Sepsis – Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge. In 2018.

66. Schmoch T, Brenner, T, Weigand, MA. Neue internationale Sepsis-Leitlinien 2021 - Was ist neu - was bleibt gleich? *Anästh Intensiv*. 2022;(63):123–8.
67. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, u. a. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Crit Care Med*. November 2021;49(11):e1063-1143.
68. Herold G. *Innere Medizin*. Köln: De Gruyter; 2021. S. 323-326.
69. ARTCLINE GmbH. Das Prinzip [Internet]. [zitiert 14. Dezember 2022]. Verfügbar unter: <https://www.artcline.de/technologie/das-prinzip/>
70. Sauer M, Altrichter J, Haubner C, Pertschy A, Wild T, Doß F, u. a. Bioartificial Therapy of Sepsis: Changes of Norepinephrine-Dosage in Patients and Influence on Dynamic and Cell Based Liver Tests during Extracorporeal Treatments. *BioMed Res Int*. Juni 2016;2016:1–11.
71. Altrichter J, Sauer M, Kaftan K, Birken T, Gloger D, Gloger M, u. a. Extracorporeal cell therapy of septic shock patients with donor granulocytes: a pilot study. *Crit Care*. 2011;15(2):R82.
72. Sauer M, Richter G, Altrichter J, Wild T, Doß F, Mencke T, u. a. Effects of Bioreactor-Oxygenation During Extracorporeal Granulocytes Treatment in Septic Patients: Bioartificial Therapy of Sepsis. *Ther Apher Dial*. August 2018;22(4):389–98.
73. Mitzner SR, Freytag J, Sauer M, Kleinfeldt T, Altrichter J, Klohr S, u. a. Use of Human Preconditioned Phagocytes for Extracorporeal Immune Support: Introduction of a Concept. *Ther Apher Dial*. Oktober 2001;5(5):423–32.
74. Volk HD, Reinke P, Krausch D, Zuckermann H, Asadullah K, Müller JM, u. a. Monocyte deactivation-rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med*. Oktober 1996;22(S4):474–81.
75. van der Poll T, Shankar-Hari M, Wiersinga WJ. The immunology of sepsis. *Immunity*. November 2021;54(11):2450–64.
76. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amiot L, u. a. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock*. Dezember 2002;18(6):487–94.
77. Le Tulzo Y, Pangault C, Amiot L, Guilloux V, Tribut O, Arvieux C, u. a. Monocyte Human Leukocyte Antigen–DR Transcriptional Downregulation by Cortisol during Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med*. Mai 2004;169(10):1144–51.
78. Höflich C, Volk HD. Immunmodulation in der Sepsis. *Chir*. November 2002;73(11):1100–4.
79. Bundesärztekammer. Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und

- Plasmaderivaten - Gesamtnovelle 2020 [Internet]. 2020 [zitiert 30. Januar 2023]. Verfügbar unter: <https://www.bundesaerztekammer.de/themen/medizin-und-ethik/wissenschaftlicher-beirat/stellungnahmen-richtlinien-jahresberichte/haemotherapie-transfusionsmedizin/querschnitts-leitlinien-baek-zur-therapie-mit-blutkomponenten-und-plasmaderivaten-gesamtnovelle-2020>
80. Klinkmann G, Wild T, Heskamp B, Doss F, Doss S, Arseniev L, u. a. Extracorporeal immune cell therapy of sepsis: ex vivo results. *Intensive Care Med Exp*. Dezember 2022;10(1):26.
81. Lmb Technologie GmbH. Broschüre: DONOpack - blood bag system [Internet]. [zitiert 13. November 2020]. Verfügbar unter: <http://www.lmb.de/download/brochure/26>
82. IMUGARD® III Leukocyte Filter System [Internet]. [zitiert 13. Dezember 2020]. Verfügbar unter: <https://www.terumobct.com/imugard>
83. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*. September 1998;62(3):597–635.
84. Merck KGaA. Zelldissoziationsreagenzien [Internet]. [zitiert 12. Januar 2023]. Verfügbar unter: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/products/cell-culture-and-analysis/cell-culture-supplements-and-reagents/cell-dissociation-reagents>
85. Serres F de, Blanco I. Role of alpha-1 antitrypsin in human health and disease. *J Intern Med*. Oktober 2014;276(4):311–35.
86. Mediatech, Inc. A Corning Subsidiary. Sell Sheet: Accutase Cell Detachment Solution [Internet]. [zitiert 10. November 2021]. Verfügbar unter: https://www.corning.com/catalog/cls/documents/product-information-sheets/Sell_Sheet_CLS-CG-052_Accutase.pdf
87. Schmitz S. *Der Experimentator: Zellkultur*. Heidelberg: Springer Spektrum; 2020. S. 173-187.
88. Capricorn Scientific GmbH. Product Info Accutase [Internet]. [zitiert 10. Januar 2021]. Verfügbar unter: http://www.capricorn-scientific.com/fileadmin/content/Product_Information/Product_Info_ACC-1B.pdf
89. Muster-Standardarbeitsanweisung für den Sysmex Hämatologieanalysator KX-21N [Internet]. 2014 [zitiert 30. Dezember 2020]. Verfügbar unter: https://www.sysmex.de/fileadmin/media/f101/Muster-Standardarbeitsanweisung/SOP_KX-21N.pdf
90. Via1-Cassette™ [Internet]. [zitiert 18. Februar 2023]. Verfügbar unter: <https://chemometec.de/via1-cassette/>

91. Performance of NucleoCounter® NC-200™ The NucleoCounter® NC-200™ offer precise measurement of cell concentrations and viability [Internet]. 2016 [zitiert 20. Dezember 2020]. Verfügbar unter: <https://chemometec.com/wp-content/uploads/2016/06/Performance-of-NucleoCounter-NC-200.pdf>
92. Shah D, Naciri M, Clee P, Al-Rubeai M. NucleoCounter—An efficient technique for the determination of cell number and viability in animal cell culture processes. *Cytotechnology*. Mai 2006;51(1):39–44.
93. Yonenaga K, Nishizawa S, Akizawa M, Asawa Y, Fujihara Y, Takato T, u. a. Utility of NucleoCounter for the chondrocyte count in the collagenase digest of human native cartilage. *Cytotechnology*. Dezember 2012;62(6):539–45.
94. Angerpointner K. Phagozytoseaktivität nach Implantation bioresorbierbarer Materialien in wachsenden Ratten. Medizinische Universität Graz; 2012. S. 24.
95. Langefeld TW. Durchflußzytometrische Untersuchungen zur Funktion polymorphkerniger Granulozyten und Monozyten bei dem Krankheitsbild des Diabetes mellitus Typ II. Justus-Liebig-Universität Giessen; 2001. S. 27-30.
96. Nunes P, Demarex N. The role of calcium signaling in phagocytosis. *J Leukoc Biol*. Juli 2010;88(1):57–68.
97. Glycotope Biotechnology GmbH. Instructions PHAGOTEST™ Version 07/14. Heidelberg; 2014.
98. Nebe Thomas C. Phagozytose-Test. Heidelberg; EP0435226B1.
99. Glycotope Biotechnology GmbH. Instructions for Use PHAGOBURST™ Version 10/14. Heidelberg; 2014.
100. Abbas Rashidbaigi; Mei-June Liao; Ji Hua; Maninder Sidhu. Recovery of functional human leukocytes from recycled filters. 5,989,441, 1999.
101. Cell Dissociation Protocol using Trypsin [Internet]. [zitiert 23. November 2022]. Verfügbar unter: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/cell-dissociation-with-trypsin>
102. Sonnaert M, Luyten FP, Schrooten J, Papantoniou I. Bioreactor-Based Online Recovery of Human Progenitor Cells with Uncompromised Regenerative Potential: A Bone Tissue Engineering Perspective. Goncalves R, Herausgeber. *PLOS ONE*. August 2015;10(8):e0136875.
103. Chen RH, Zhu J, Zhang RZ, Wang SY, Li Y. The tolerance of human epidermal cells to trypsinization in vitro. *Cell Tissue Bank*. Juni 2020;21(2):257–64.
104. Ivetic A, Hoskins Green HL, Hart SJ. L-selectin: A Major Regulator of Leukocyte

Adhesion, Migration and Signaling. *Front Immunol.* Mai 2019;10:1068.

105. Kawashima H, Li YF, Watanabe N, Hirose J, Hirose M, Miyasaka M. Identification and characterization of ligands for L-selectin in the kidney. I. Versican, a large chondroitin sulfate proteoglycan, is a ligand for L-selectin. *Int Immunol.* März 1999;11(3):393–405.

106. Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med.* Juni 2003;9(6):263–8.

107. Wedepohl S, Beceren-Braun F, Riese S, Buscher K, Enders S, Bernhard G, u. a. L-Selectin – A dynamic regulator of leukocyte migration. *Eur J Cell Biol.* April 2012;91(4):257–64.

108. Neue A, Rzeniewicz K, König M, Schroer CFE, Joachim J, Rey-Gallardo A, u. a. Serine Phosphorylation of L-Selectin Regulates ERM Binding, Clustering, and Monocyte Protrusion in Transendothelial Migration. *Front Immunol.* September 2019;10:2227.

109. Smalley DM, Ley K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med.* April 2005;9(2):255–66.

110. Hogarth PM, Maxwell KF, Powell MS, Hulett MD, Barton PA, McKenzie IFC, u. a. Crystal structure of the human leukocyte Fc receptor, FcγRIIa. *Nat Struct Biol.* Mai 1999;6(5):437–42.

111. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol.* Januar 2008;8(1):34–47.

112. Masuda S, Nakazawa D, Shida H, Miyoshi A, Kusunoki Y, Tomaru U, u. a. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clin Chim Acta.* August 2016;459:89–93.

113. Thiam HR, Wong SL, Wagner DD, Waterman CM. Cellular Mechanisms of NETosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* Oktober 2020;36(1):191–218.

114. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, u. a. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science.* März 2004;303(5663):1532–5.

115. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* Februar 2018;18(2):134–47.

116. Lögters T, Margraf S, Altrichter J, Cinatl J, Mitzner S, Windolf J, u. a. The clinical value of neutrophil extracellular traps. *Med Microbiol Immunol (Berl).* November 2009;198(4):211–9.

117. Walzog B, Fandrey J. Blutgerinnung. In: Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S, Herausgeber. *Physiologie.* 9. Aufl. Georg Thieme Verlag KG; 2019.

118. Mann KG, Whelihan MF, Butenas S, Orfeo T. Citrate anticoagulation and the dynamics

- of thrombin generation. *J Thromb Haemost.* Oktober 2007;5(10):2055–61.
119. Keck T, Friebe V, Warshaw AL, Antoniu BA, Waneck G, Benz S, u. a. Pancreatic proteases in serum induce leukocyte-endothelial adhesion and pancreatic microcirculatory failure. *Pancreatology.* Januar 2005;5(2–3):241–50.
120. Roxvall L, Bengtson A, Sennerby L, Heideman M. Activation of the Complement Cascade by Trypsin. *Biol Chem Hoppe Seyler.* Januar 1991;372(1):273–8.
121. Bettac L, Denk S, Seufferlein T, Huber-Lang M. Complement in Pancreatic Disease—Perpetrator or Savior? *Front Immunol.* Januar 2017;8.
122. Uribe-Querol E, Rosales C. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Front Immunol.* Juni 2020;11:1066.
123. van Lookeren Campagne M, Wiesmann C, Brown EJ. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell Microbiol.* September 2007;9(9):2095–102.
124. Rawish E, Sauter M, Sauter R, Nording H, Langer HF. Complement, inflammation and thrombosis. *Br J Pharmacol.* Juli 2021;(178):2892–904.
125. Xu Y, Plazyo O, Romero R, Hassan SS, Gomez-Lopez N. Isolation of Leukocytes from the Human Maternal-fetal Interface. *J Vis Exp.* Mai 2015;(99):52863.
126. Gartner S. The Macrophage and HIV: Basic Concepts and Methodologies. In: Vicenzi E, Poli G, Herausgeber. *Human Retroviruses.* 2014. S. 207–20. (Methods in Molecular Biology; Bd. 1087).
127. Teleron AA, Carlson B, Young PP. Blood donor white blood cell reduction filters as a source of human peripheral blood-derived endothelial progenitor cells. *Transfusion (Paris).* Januar 2005;45(1):21–5.
128. He H, Tang L, Jiang N, Zheng R, Li W, Gu Y, u. a. Characterization of peripheral blood mononuclear cells isolated using two kinds of leukocyte filters. *Transfus Clin Biol* 27 2020. November 2019;10–7.
129. Loi MM, Kelher M, Dzieciatkowska M, Hansen KC, Banerjee A, West FB, u. a. A comparison of different methods of red blood cell leukoreduction and additive solutions on the accumulation of neutrophil-priming activity during storage. *Transfusion (Paris).* August 2018;58(8):2003–12.
130. Stoller JK, Aboussouan LS. α 1-antitrypsin deficiency. *The Lancet.* Juni 2005;365(9478):2225–36.
131. Sasani N, Roghanian R, Emtiazi G, Jalali SM, Nikougoftar Zarif M, Aghaie A. Design and introduction of a rational mechanical eluting system for leukocyte recovery from leukoreduction filters: A cell differential approach. *Transfus Clin Biol.* August

2020;27(3):172–8.

132. Meer PF, Pietersz RNI, Nelis JT, Hinloopen B, Dekker WJA, Reesink HW. Six filters for the removal of white cells from red cell concentrates, evaluated at 4°C and/or at room temperature. *Transfusion (Paris)*. März 1999;39(3):265–70.

133. Weitkamp J.-H., Crow, J. E. Jr. Blood Donor Leukocyte Reduction Filters as a Source of Human B Lymphocytes. *BioTechnique*. September 2001;31:464–6.

134. Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, Herausgeber. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen - Therapie - Methodik*. 4. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2010. S. 328-329.

135. Herter J, Zarbock A. Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. *J Immunol*. Mai 2013;190(9):4451–7.

136. Pötzsch B, Müller-Berghaus G, Gawaz MP, Herausgeber. *Hämostaseologie: mit 163 Tabellen [Grundlagen, Diagnostik, Therapie]*. 2. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2010. S. 92.

137. Merten M, Thiagarajan P. P-Selectin Expression on Platelets Determines Size and Stability of Platelet Aggregates. *Circulation*. Oktober 2000;102(16):1931–6.

138. Stenecker I, Pietersz RNI, Reesink HW. Leukocyte Filtration Mechanisms. Factors Influencing the Removal of Infectious Agents From red Cell Concentrates. *Immunol Invest*. Januar 1995;24(1–2):87–93.

139. Stenecker I, Prins H, Florie M, Loos J, Biewenga J. Mechanisms of white cell reduction in red cell concentrates by filtration: the effect of the cellular composition of the red cell concentrates. *Transfusion (Paris)*. Januar 1993;33(1):42–50.

140. Spencer S, Tang A, Khoshbin E. Leukodepletion for patients undergoing heart valve surgery. *Cochrane Heart Group*, Herausgeber. *Cochrane Database Syst Rev*. Juli 2013;(7).

141. Mei K, Du L, Yan M, Zhang Z, Zhang F, Gong L, u. a. Modified Leukocyte Filter Removes Tumor Cells from the Salvaged Blood. *Chalmers J*, Herausgeber. *PLOS ONE*. Juni 2015;10(6):e0130864.

142. Gwak MS, Lee KW, Kim SY, Lee J, Joh JW, Kim SJ, u. a. Can a leukocyte depletion filter (LDF) reduce the risk of reintroduction of hepatocellular carcinoma cells? *Liver Transpl*. März 2005;11(3):331–5.

143. Smit JJJ, de Vries AJ, Gu YJ, van Oeveren W. Efficiency and safety of leukocyte filtration during cardiopulmonary bypass for cardiac surgery. *Transfus Sci*. Juni 1999;20(3):151–65.

144. Schmitz S. *Der Experimentator: Zellkultur*. 3. Aufl. Heidelberg: Springer Spektrum;

2011. S. 206-207.

145. Al-Rubeai M, Welzenbach K, Lloyd DR, Emery AN. A rapid method for evaluation of cell number and viability by flow cytometry. *Cytotechnology*. Juli 1997;24(2):161–8.

146. Crowley LC, Scott AP, Marfell BJ, Boughaba JA, Chojnowski G, Waterhouse NJ. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*. Juli 2016;2016(7).

147. Lang, G. Zellkultur. In: *Histotechnik - Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Wien: Springer-Verlag; 2006. S. 327.

148. Nielson L, Smyth G, Greenfield P. Hemacytometer Cell Count Distributions: Implications of Non-Poisson Behavior. *Biotechnol Prog*. November 1991;7(6):560–3.

149. Patel KA, Patel N, Kim GH, Chape LS, Agbon KGD, Angulo Fuentes MP, u. a. Validation of automated fluorescent-based technology for measuring total nucleated cell viability of hematopoietic progenitor cell products. *Transfusion (Paris)*. April 2022;62(4):848–56.

150. Katayama K, Wang M, Ogawa N, Ikehara S, Liu CY, Xia MQ, u. a. Effect of lifestyle and health behavior on neutrophil function. *Nihon Eiseigaku Zasshi Jpn J Hyg*. Mai 2011;66(3):573–81.

151. Tsukamoto K, Suzuki K, Machida K, Saiki C, Murayama R, Sugita M. Relationships between lifestyle factors and neutrophil functions in the elderly. *J Clin Lab Anal*. Januar 2002;16(5):266–72.

152. Brandes R, Lang F, Schmidt RF, Herausgeber. *Springer-Lehrbuch - Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2019. S. 19.

9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

9.1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1:</i> Schematische Darstellung des Aufbaus des zellulären Immunsystems mit Einteilung der Leukozyten.	2
<i>Abb. 2:</i> Schematische Darstellung einer Blutprobe im Zentrifugenröhrchen oder Blutbeutel nach der Zentrifugation.	5
<i>Abb. 3:</i> Schematische Darstellung eines Tiefenfilters (links) und eines Siebfilters (rechts).	7
<i>Abb. 4:</i> Schematische Darstellung des ARTICE [®] -Verfahrens.	10
<i>Abb. 5:</i> Dargestellt ist ein DONOpack-Filter der Firma Lmb Technologie GmbH.	16
<i>Abb. 6:</i> Dargestellt ist ein Imugard [®] III RC-Filter der Firma Terumo BCT.	16
<i>Abb. 7:</i> Schematische Darstellung eines Filtrationsvorgangs.	17
<i>Abb. 8:</i> Schematische Darstellung der Spülung eines Leukozytendepletionsfilters in Flussrichtung (links) und entgegen der Flussrichtung (rechts).	18
<i>Abb. 9:</i> Beispielhafte Einteilung der Leukozyten-Populationen in der Durchflusszytometrie	23
<i>Abb. 10:</i> Exemplarische Darstellung einer Messung der Phagozytose-Fähigkeit mittels FACSCalibur.	25
<i>Abb. 11:</i> Exemplarische Darstellung der Overlay-Methode zur Bestimmung der Phagozytose-Rate am MACSQuant.	26
<i>Abb. 12:</i> Exemplarische Darstellung einer Messung der Fähigkeit zum oxidativen Burst mittels FACSCalibur.	27
<i>Abb. 13:</i> Exemplarische Darstellung der Overlay-Methode zur Bestimmung der Oxyburst-Rate am MACSQuant.	27
<i>Abb. 14:</i> Beispiel eines Blutausstrichs eines Buffy Coats	31
<i>Abb. 15:</i> Beispiel eines Granulozyten-Nests	31
<i>Abb. 16:</i> Beispiel eines typischen Blutausstrichs bei Spülung eines DONOpack-Filters (Lmb Technologie) nach der Filtration	34
<i>Abb. 17:</i> Grafische Darstellung der Leukozytenausbeute (y-Achse in [%]) aus DONOpack-Filtern (Lmb Technologie) zu unterschiedlichen Inkubationszeiten mit Trypsin sowie aus einfacher Rückspülung (x-Achse).	36
<i>Abb. 18:</i> Beispiel eines typischen Blutausstrichs bei Spülung eines DONOpack-Filters (Lmb Technologie) nach Inkubation mit Trypsin	37

Abb. 19: Grafische Darstellung der Leukozytenausbeute (y-Achse in [%]) aus DONOpack-Filtern (Lmb Technologie) zu unterschiedlichen Inkubationszeiten mit Accutase sowie aus einfacher Rückspülung (x-Achse). 40

Abb. 20: Beispiel eines typischen Blutausstrichs bei Spülung eines DONOpack-Filtern (Lmb Technologie) nach Inkubation mit Accutase..... 41

Abb. 21: Beispiel eines typischen Blutausstrichs nach Thrombozytenreduktion eines Buffy Coats, Ersatz des Überstandes mit 0,9% NaCl sowie Filtration über einen DONOpack-Filter von Lmb Technologie 43

Abb. 22: Exemplarische Darstellung eines typischen Blutausstrichs bei Spülung eines Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) nach der Filtration 45

Abb. 23: Geleeartiges Konglomerat im Überstand der 2. Spülung bei 15-minütiger Inkubation eines Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) mit Trypsin. 47

Abb. 24: Grafische Darstellung der Leukozytenausbeute (y-Achse in [%]) aus Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) zu unterschiedlichen Inkubationszeiten mit Trypsin sowie aus einfacher Rückspülung (x-Achse). 48

Abb. 25: Beispiel eines typischen Blutausstrichs bei Spülung eines Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) nach Inkubation mit Trypsin 49

Abb. 26: Grafische Darstellung der Leukozytenausbeute (y-Achse in [%]) aus Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) zu unterschiedlichen Inkubationszeiten mit Accutase sowie aus einfacher Rückspülung (x-Achse). 52

Abb. 27: Beispiel eines typischen Blutausstrichs nach Inkubation eines Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) mit Accutase für 25min 53

Abb. 28: Beispiel eines typischen Blutausstrichs nach Thrombozytenreduktion eines Buffy Coats, Ersatz des Überstandes mit 0,9% NaCl sowie Filtration über einen Imugard® III RC-Filter von Terumo BCT 54

Abb. 29: Grafische Darstellung der Leukozytenausbeute (y-Achse in [%]) aus DONOpack-Filtern (Lmb Technologie, orange) und Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT, blau) nach Rückspülung mit 200ml 0,9% NaCl (x-Achse). 55

Abb. 30: Grafische Darstellung der maximalen Leukozytenausbeute (y-Achse in [%]) aus DONOpack-Filtern (Lmb Technologie, orange) und Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT, blau) nach Inkubation mit Trypsin für 15min (DONOpack) bzw. 20min (Terumo) (x-Achse). 57

Abb. 31: Grafische Darstellung der maximalen Leukozytenausbeute (y-Achse in [%]) aus DONOpack-Filtern (Lmb Technologie, orange) und Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT,

blau) nach Inkubation mit Accutase für 15min (DONOpack) bzw. 25min (Terumo) (x-Achse).
 58
Abb. 32: Grafische Darstellung der maximalen Leukozytenausbeute (y-Achse in [%]) aus DONOpack-Filtern (Lmb Technologie) sowie Imugard[®] III RC-Filtern (Terumo BCT) nach Thrombozytenreduktion des Buffy Coats (x-Achse). 60
Abb. 33: Darstellung einiger Leukozyten bei Inkubation eines Buffy Coats mit Trypsin für 20min..... 62
Abb. 34: Grafische Darstellung der Phagozytose-Fähigkeit (y-Achse in [%]) von Leukozyten aus Buffy Coats nach Inkubation mit Accutase für unterschiedliche Inkubationszeiten (x-Achse)..... 63
Abb. 35: Darstellung der Fähigkeit zum oxidativen Burst (y-Achse in [%]) von Leukozyten aus Buffy Coats nach Inkubation mit Accutase für unterschiedliche Inkubationszeiten (x-Achse).
 64
Abb. 36: Darstellung einiger Leukozyten bei Inkubation eines Buffy Coats mit Accutase für 25 min..... 64

9.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Darstellung der Zusammensetzung der ungefilterten Buffy Coats..... 29
Tab. 2: Darstellung der Funktionalität (Phagozytose, oxidativer Burst) und Vitalität von Leukozyten aus Buffy Coats. 30
Tab. 3: Darstellung der Leukozytenausbeute bei Spülung von DONOpack-Filtern (Lmb Technologie) mit 4 x 50ml 0,9% NaCl in und entgegen der Flussrichtung. 32
Tab. 4: Ergebnisse der Funktionsanalysen von Leukozyten des ungefilterten Buffy Coats und des Buffy Coats nach Filtration über einen DONOpack-Filter (Lmb Technologie) mittels Durchflusszytometrie. 33
Tab. 5: Darstellung der Leukozytenausbeute zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei Inkubation von DONOpack-Filtern (Lmb Technologie) mit Trypsin mit steigender Inkubationszeit. Zusätzlich ist die Vitalitätsanalyse der jeweils gewonnen Leukozyten nach initialer Spülung und am Folgetag aufgeführt. 35
Tab. 6: Ergebnisse der Funktionsanalysen von Leukozyten des ungefilterten Buffy Coats und des Buffy Coats nach Trypsin-Inkubation von DONOpack-Filtern (Lmb Technologie) für 15min mittels Durchflusszytometrie. 38
Tab. 7: Darstellung der Leukozytenausbeute zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei Inkubation von DONOpack-Filtern (Lmb Technologie) mit Accutase mit steigender Inkubationszeit.

Zusätzlich ist die Vitalitätsanalyse der jeweils gewonnen Leukozyten nach initialer Spülung aufgeführt.	39
Tab. 8: Ergebnisse der Funktionsanalysen von Leukozyten des ungefilterten Buffy Coats und des Buffy Coats nach Accutase-Inkubation von DONOpack-Filtern (Lmb Technologie) für 15min mittels Durchflusszytometrie.	42
Tab. 9: Darstellung der Leukozytenausbeute bei Spülung von Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) mit 4 x 50ml 0,9% NaCl in und entgegen der Flussrichtung.	44
Tab. 10: Ergebnisse der Funktionsanalysen von Leukozyten des ungefilterten Buffy Coats und des Buffy Coats nach Filtration über Imugard® III RC-Filter (Terumo BCT) mittels Durchflusszytometrie.	45
Tab. 11: Darstellung der Leukozytenausbeute zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei Inkubation von Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) mit Trypsin mit steigender Inkubationszeit. Zusätzlich ist die Vitalitätsanalyse der jeweils gewonnen Leukozyten nach initialer Spülung und am Folgetag aufgeführt.	46
Tab. 12: Ergebnisse der Funktionsanalysen von Leukozyten des ungefilterten Buffy Coats und des Buffy Coats nach Trypsin-Inkubation von Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) für 15min mittels Durchflusszytometrie.	50
Tab. 13: Darstellung der Leukozytenausbeute zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei Inkubation von Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) mit Accutase mit steigender Inkubationszeit sowie die Vitalitätsanalyse der Leukozyten nach 25-minütiger Inkubation.....	51
Tab. 14: Ergebnisse der Funktionsanalysen von Leukozyten des ungefilterten Buffy Coats und des Buffy Coats nach Accutase-Inkubation von Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) für 25min mittels Durchflusszytometrie.	52
Tab. 15: Gegenüberstellung der Funktionalitäts- und Vitalitätsmessung von Leukozyten aus DONOpack-Filtern (Lmb Technologie) und Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) nach einfacher Rückspülung mit 0,9% NaCl.....	56
Tab. 16: Gegenüberstellung der Funktionalitäts- und Vitalitätsmessung von Leukozyten aus DONOpack-Filtern (Lmb Technologie) sowie Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) nach Inkubation mit Trypsin für 15min.	57
Tab. 17: Gegenüberstellung der Funktionalitäts- und Vitalitätsmessung von Leukozyten aus DONOpack-Filtern (Lmb Technologie) sowie Imugard® III RC-Filtern (Terumo BCT) nach Inkubation mit Accutase (DONOpack: 15min, Terumo: 25min).....	59
Tab. 18: Veränderung der Gesamtleukozytenzahl (absolut und prozentual) durch die Inkubation eines Buffy Coats mit Trypsin für 10, 15, 20, 25min.....	60

Tab. 19: Veränderung der Gesamtleukozytenzahl (absolut und prozentual) durch die Inkubation eines Buffy Coats mit Trypsin für 10, 15, 20, 25min..... 61

Tab. 20: Veränderungen der Gesamtleukozytenzahl (absolut und prozentual) und der Leukozytenvitalität durch die Inkubation eines Buffy Coats mit Trypsin für 10, 15, 20, 25min 61

Tab. 21: Darstellung der Veränderungen der Leukozytenzahl (absolut und prozentual) und der Leukozytenvitalität eines Buffy Coats nach Inkubation mit Accutase für 10, 15, 20, 25min. 62

10 Danksagung

Ich möchte einen herzlichen Dank an alle Personen aussprechen, die mich während der Arbeit im Labor und bei der Ausarbeitung dieser Dissertation unterstützt haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Mitzner sowie Herrn Dr. med. Altrichter von der ARTCLINE GmbH für die Themenvergabe und die fortwährende Unterstützung bei der Ausarbeitung des Themas.

Weiterhin danke ich dem Team der ARTCLINE GmbH für die Hilfe bei der Umsetzung während der Labortätigkeit. Insbesondere danke ich Magdalena Milej, Christian Augustin, Thomas Wild und Fanny Doss. Ein besonderer Dank geht an meine Betreuerin Dr. Sandra Doss, die zu jeder Tages- und Nachtzeit für mich erreichbar war.

Weiterhin geht mein Dank an das Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Rostock für die Bereitstellung der Buffy Coats.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freundinnen und Freunden für die Unterstützung außerhalb von Labor und Bibliothek.

11 Curriculum Vitae

12 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich durch eigenhändige Unterschrift, die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Die aus den Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Dissertation ist in dieser Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Berlin, 20. Februar 2023

Unterschrift

13 Anhang

13.1 Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Hämatologie-Analysator KX-21N	Sysmex Deutschland GmbH (Norderstedt, Deutschland)
TS-CD-II	Terumo BCT (Lakewood, USA)
Sure Seal Tube Sealer	Centron Technologies, Inc. (Anyang, Südkorea)
Waage Modell SE 622	VWR International GmbH (Radnor, USA)
Rüttler Sunlab SU 1030	neoLab® (Heidelberg, Deutschland)
Vacuum Aspiration System Modell D-9330/1	neoLab® (Heidelberg, Deutschland)
Standkühlzentrifuge 8KS	Sigma Laborzentrifugen GmbH (Osterode am Harz, Deutschland)
CO ₂ -Inkubator BD 6220	Thermo Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
NucleoCounter® NC200™	ChemoMetec A/S (Allerød, Dänemark)
Pasteurpipette	VWR International GmbH (Radnor, USA)
Sterilwerkbank Herasafe KS 12	Kendro Laboratory Products GmbH (Langenselbold, Deutschland)
Centrifuge 5417C	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Vortex V-1 plus	SIA BIOSAN (Riga, Litauen)
Vortexer Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Blutgasanalysator ABL90flex	Radiometer Medical ApS (Krefeld, Deutschland)
MACS QUANT 16	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland)
FACS Calibur™	BD Biosciences (San Jose, USA)
Wasserbad Type WNE22	Memmert GmbH (Schwabach, Deutschland)
Mikroskop VisiScope TL385FL	VWR International GmbH (Radnor, USA)
Pipette ACURA® 100-1000µl	Socorex (Ecublens, Schweiz)
Pipette ACURA® 10-100µl	Socorex (Ecublens, Schweiz)
Pipette ACURA® 0,5-10µl	Socorex (Ecublens, Schweiz)
Timer Digital Clock	VWR International GmbH (Radnor, USA)

13.2 Verwendete Materialien

Material	Hersteller
Imugard [®] III RC Leukozytendepletionsfilter	Terumo BCT (Lakewood, USA)
DONOpack Leukozytendepletionsfilter	Lmb Technologie GmbH (Schwaig, Deutschland)
Auffangbeutel (ohne Zusätze)	Lmb Technologie GmbH (Schwaig, Deutschland)
Einmalspritze 50ml Omnifix [®]	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Einmalspritze 20ml BD Discardit [™] II	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Einmalspritze 30 ml Soft-Ject [®]	Henke Sass Wolf GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
Einmalspritze 5ml BD Discardit [™] II	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Pipettenspitze 100-1000µl	VWR International GmbH (Radnor, USA)
Pipettenspitze 200µl	VWR International GmbH (Radnor, USA)
Pipettenspitze 10µl	VWR International GmbH (Radnor, USA)
Serologische Pipette 50ml	VWR International GmbH (Radnor, USA)
Serologische Pipette 5ml	VWR International GmbH (Radnor, USA)
Serologische Pipette 10ml	VWR International GmbH (Radnor, USA)
Heidelberger Verlängerung 30cm	Wolfram Droh GmbH (Mainz, Deutschland)
FACS-Rundbogen-Röhrchen FALCON [™] , 5ml	Coming Life Sciences (Glendale, Arizona)
Super Premium Microscope Slide	VWR International GmbH (Radnor, USA)
Teruflex [®] Transfer Bag 150 ml	Terumo BCT (Lakewood, USA)
EppendorfRöhrchen 1,5ml	greiner bio-one GmbH (Frickenhäusen, Deutschland)
EppendorfRöhrchen 15ml	VWR International GmbH (Radnor, USA)
EppendorfRöhrchen 50ml	VWR International GmbH (Radnor, USA)
Discofix [®] Drei-Wege-Hahn	B.Braun (Melsungen, Deutschland)
Vial-Cassette [™]	ChemoMetec A/S (Allerød, Dänemark)
Combifix [®] Adapter Luer-Lock	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Becherglas 600 ml	VWR International GmbH (Radnor, USA)
Schere	
Schlauchklemmen	

13.3 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien / Reagenzien	Hersteller
Buffy Coat	Universitätsmedizin Rostock
Fresh Frozen Plasma	Universitätsmedizin Rostock
HAEMA- Schnellfärbung	Labor + Technik Eberhard Lehmann GmbH (Berlin, Deutschland)
Reagenzienkit PHAGOTEST™	Celonic Deutschland GmbH & Co. KG (Heidelberg, Deutschland)
Reagenzienkit PHAGOBURST™	Celonic Deutschland GmbH & Co. KG (Heidelberg, Deutschland)
MACSQuant Running Buffer	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland)
MACSQuant Washing Solution	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland)
MACSQuant/ MACSima Storage Solution	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Monovette Li-Heparin 2,7 ml (16 IU/ml)	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Calciumchloridlösung 0,5 mmol/ml	Serumwerk Bernburg AG (Bernburg, Deutschland)
FACSRinse	BD Biosciences (San Jose, USA)
FACSFlow™	BD Biosciences (San Jose, USA)
FACSClean	BD Biosciences (San Jose, USA)
Accutase™ (1X)	Capricorn Scientific (Ebsdorfergrund, Deutschland)
Accutase® (1X)	Coming® (Manassas, USA)
Trypsin EDTA (1X)	Coming® (Manassas, USA)
0,9% NaCl 500 ml	B. Braun (Melsungen, Deutschland)/ Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
Dulbecco's PBS (1X, ohne Ca ²⁺ , Mg ⁺)	VWR International GmbH (Radnor, USA)
Immersionsöl	VWR International GmbH (Radnor, USA)