

2 Material und Methoden

2.1 Vorbereitung zur Akkreditierung

Die Einführung eines Qualitätsmanagementprogramms zum Zwecke der Akkreditierung und internationaler Vergleichbarkeit der Messergebnisse gliederte sich in folgende Abschnitte:

Information und Motivation aller Mitarbeiter über das Ziel der definierten Qualität: Die Einführung eines solchen Programmes erfordert ausnahmslos die aktive Mitarbeit aller am Prozess Beteiligten. Der Sinn der Maßnahme muss von allen eingesehen und akzeptiert werden. Daher musste das Wesen und die Art der Qualitätskontrolle in verständlicher Form vom Projektleiter vorgestellt werden, der über die notwendige Kompetenz, Überzeugungskraft und Autorität verfügt.

- a. Persönliche Schulung und Vorbereitung des Direktors des Institutes
- b. Benennung eines Qualitätsbeauftragten (PD Dr. Bäumlner)

Schulung der Mitarbeiter durch den Institutsdirektor und den Qualitätsbeauftragten unter Aufsicht des Autors als einem externen erfahrenen Berater, der seit 1992 in mehreren Laboratorien bereits ein QS System eingeführt hat und hier die Funktion des Projektleiters übernimmt.

Bestandsaufnahme

- a. Erfassung der Bestände der Abteilung einschließlich der Räume, Geräte, Möbel, Kommunikationssysteme, Soft- und Hardware, Anschlüsse, Klimatisierung, Wasser- und Gasanschlüsse.
- b. Workflow von Proben und Produkten.
- c. Bisherige Sicherheitsmaßnahmen.
- d. Spezielle Definitionsbereiche für infektiöse oder gefährliche Proben.
- e. Erfassung aller Arbeitsabläufe in Produktion und Analytik
- f. Durchführung der Bestandsaufnahme durch den Direktor des Institutes, den Qualitätsbeauftragten sowie eine externe CAP Spezialistin, die Assistentin des Autors, Frau Lesch-Merheim

Planung der operativen Schritte

- a. Erstellung einer Verfahrensanweisung zum Verfassen einer Standard Operation Procedure (SOP) und Schulung von Mitarbeitern

- b. Die Mitarbeiter, die die Arbeitsvorgänge durchführen, schrieben die Standard Operation Procedures (SOP) für alle Methoden des Instituts,
 - Präparative Arbeitsvorgänge
 - Analytische Arbeitsvorgänge
- c. Die Versuchs-SOP's wurden einer kritischen Sichtung in hierarchischer Reihenfolge durch die Spezialisten unterzogen: Qualitätsbeauftragter, Institutsdirektor, Projektleiter
- d. Trouble Shooting: Aufgetretene Fehler und Mängel wurden analysiert und Wege zur Beseitigung erarbeitet-
- e. Anlegen eines Organigramms mit der Darstellung von Funktion und Verantwortlichkeit der Beteiligten.

Spezielle Vorbereitung zum CAP-Audit

- a. Definition der Schulungsprogramme, Häufigkeit und Wiederholungen
- b. Definition aller Verantwortlichen und ihrer Qualifikation und Funktion
- c. Definition der Qualitäts- und Inprozesskontrollen
- d. Schulung durch Dr. Peters, den internationalen Chef-Inspektor des CAP

Umsetzung des Qualitätsmanagement-Programms in die Praxis

- a. Einbeziehung aller gesetzlich vorgeschriebenen Verordnungen, Richtlinien und empfohlenen Regelungen einschließlich Unfallverhütung und Brandschutz
- b. Angleichung der präparativen Arbeitsgänge an die SOP's
- c. Angleichung der analytischen Arbeitsgänge an die SOP's

Überwachung der Einhaltung der Vorgaben der SOP's.

Der Qualitätsbeauftragte überwacht die Arbeitsabläufe in Bezug auf korrekte Einhaltung, sichere Durchführung und peinliche Beachtung. Er kontrolliert die Mitarbeiter auf ihre Kenntnisse der SOP's und beseitigt Fehler und Versäumnisse mit Hilfe des Fehlermanagementprogrammes.

Fehlermanagement

Alle erkannten Fehler werden als solche in einem eigenen Verzeichnis schriftlich erfasst und dokumentiert. Sie werden von den Verantwortlichen untersucht und eine Wiederholung durch geeignete Maßnahmen nach Möglichkeit unterbunden. Geeignete Maßnahmen sind

persönliche Schulungen, Verbesserungen im Organisationsablauf, Beseitigung von Missverständnissen und ggf. Verbesserung der persönlichen Motivation der Mitarbeiter.

Trockenübung eines CAP-Audits

- a. Der Projektleiter verteilte an alle Gruppenleiter des Institutes die Inspektionsfragen des College of American Pathologists (CAP).
- b. Die Fragebögen wurden umfassend und vollständig ausgefüllt, dem Qualitätsbeauftragten zur Beurteilung vorgelegt und diskutiert.
- c. Fehlermanagement
 - Die bei den Fragebögen zutage getretenen Fehler wurden analysiert und mit dem Projektleiter besprochen. Durch geeignete Maßnahmen wurde eine Wiederholung vermieden und die Ursache abgestellt. Mängel wurden beseitigt, Defizite ergänzt
 - Eine erneute Schulung setzte alle Mitarbeiter über das Ergebnis der Fragebogenaktion in Kenntnis. Die Fehler wurden besprochen, eine zukünftige Vermeidung dieser Fehler ebenfalls.
- d. Die Qualitätsverantwortlichen führten unter der Beobachtung des Projektleiters ein Vor-Audit mit einem erfahrenen CAP Inspektor vom Militärkrankenhaus der amerikanischen Armee in Ramstein durch.
 - In einer dem zeitlichen Aufwand der tatsächlichen Inspektion entsprechenden Phase wurde ein Audit durch die Inspektoren des CAP simuliert. Die Verteilung der Inspektoren auf die einzelnen Bereiche entsprach ebenfalls den späteren Gegebenheiten.
 - Vor der späteren Inspektion wurde ein entsprechendes Audit durchgeführt
 - Jedes definierte Fachgebiet wurde auditiert.
 - Alle Gruppenleiter wurden von den Inspektoren geprüft.
 - Der Institutsdirektor stand dem obersten Inspektor (Projektleiter) zur Beantwortung allgemeiner und strategischer Fragen zur Verfügung.
- e. Analyse der Ergebnisse des Audits durch den Projektleiter
- f. Zusammenfassung und Auswertung aller Ergebnisse der Inspektion
- g. Probeinspektion
- h. Nach Beseitigung der Mängel und weiteren Schulungen sollte die offizielle Inspektion von den Inspektoren des CAP-International durchgeführt werden.

2.2 Leukozytendepletion

Die Vollblutkonserven wurden freiwilligen Blutspendern gemäß den Richtlinien (Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer und Paul-Ehrlich-Institut 1996, 2000) entnommen. Zur Blutentnahme wurden Vierfachblutentnahmesysteme der Hersteller Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim (Xtra Optipac, Art.-Nr. R 7451) bzw. Pall SLS GmbH, Dreieich (Leukotrap WB, Art. Nr. 800 1228) verwendet. Beide Systeme enthalten den integrierten Filter WBF-1 (Pall SLS GmbH). Die Blutentnahme erfolgte mit Hilfe von Mischwaagen (MW 5001 electronic, Fresenius NPBI, Dreieich). Die Vollblutkonserven wurden bis zur Filtration bei Raumtemperatur gelagert. Je 50 Vollblutkonserven wurden sofort, 30 Minuten, 60 Minuten oder 120 Minuten nach der Herstellung gefiltert. Die Filtrationsdauer wurde für jede Konserve erfasst. Die Filtration im Routine-Herstellungsprozess erfolgte innerhalb von 60 Minuten. Nach der Filtration wurden die Konserven bei 5000 g zentrifugiert (Hettich Roto Silenta RP, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen) und mittels eines Separators (Compo Separator, Fresenius NPBI, Dreieich) in Plasma und Erythrozytenkonzentrat in Additivlösung aufgetrennt. Als Additivlösung wurden Adsol oder PAGGS-M verwendet.

Leukozyten- und Thrombozytenmessung

Zur Bestimmung der Leukozyten- und Thrombozytenzahl wurde vor und nach Filtration nach mehrfachem Ausrollen des entsprechenden Schlauchs jeweils ein Schlauchsegment abgeschweißt. Die zelluläre Zusammensetzung wurde mit einem Blutbildautomaten Cell-Dyn 3500 (Abbott GmbH Diagnostika, Wiesbaden) gemessen. Zur Bestimmung der Leukozytenzahl nach Filtration kam eine durchflusszytometrische Methode zur Anwendung (Radtke 1995): 200 µl der Probe wurden mit 3,8 ml Erythrozyten-Lysereagenz Ortho-mune (Ortho Diagnostic Systems, Neckargemünd) versetzt, zehn Minuten inkubiert und anschließend bei 2300 g zehn Minuten zentrifugiert. 3,4 ml des Überstandes wurden abgehoben und verworfen. Das Zell-Pellet wurde resuspendiert. Anschließend wurden 5 µl anti-CD45-FITC/anti-CD14-PE (Simultest LeucoGATE, Becton Dickinson, Heidelberg) und 50 µl Eichpartikel (FACSCount Controls™ high, Becton Dickinson) hinzupipettiert. Nach 20-minütiger Inkubation erfolgte die Messung am Durchflußzytometer (FACScan, Becton Dickinson GmbH). Die Geräteeinstellung erfolgte mittels automatischer Justierung (CaliBRITE Beads und FACSComp-Software, Becton Dickinson), davon abweichend wurde der Schwellenwert auf den Fluoreszenz-Kanal eingestellt, so dass nur CD45-positive Ereignisse erfasst wurden. Die Messdauer wurde auf fünf Minuten fixiert. Die Datenerfassung erfolgte mit der Software CellQuest, die Datenauswertung mit dem Programm Attractors (Becton Dickinson GmbH). Die Leukozytenkonzentration ließ sich aus

der bekannten Konzentration der Eichpartikel und dem Verhältnis von Leukozyten- und Eichpartikel-Ereignissen berechnen. Jede Messung erfolgte als Doppelbestimmung.

Sterilitätskontrollen

Die Sterilitätstestung erfolgte im Rahmen der routinemäßigen Qualitätskontrolle der im Zeitraum von Juni 1997 bis Februar 1998 hergestellten Blutprodukte jeweils am Ende der Haltbarkeitsdauer zwischen Tag 39 und 45 nach Herstellung. Die Sterilitätstestung wurde gemäß dem Votum des Arbeitskreises Blut vom 05.05.97 (Arbeitskreis Blut beim Robert-Koch-Institut 1997) durchgeführt (BacT/Alert, Organon Teknika, Eppelheim).

2.3 Bestrahlungsverfahren

Die Bestrahlung der EK erfolgte mit Hilfe des Blutbestrahlungsgerätes IBL 437 C (Isotopen Diagnostik CIS GmbH, Dreieich), bei dem ^{137}Cs als Strahlungsquelle dient. Unter Emission eines β -Teilchens zerfällt ^{137}Cs in $^{137\text{m}}\text{Ba}$, welches sich im angeregten Zustand befindet und unter Aussendung energiereicher γ -Strahlung (661 keV) in den Grundzustand ^{137}Ba übergeht. Im Zentrum der Drehtrommel des Bestrahlungsbehälters wird bei vollständig gefülltem Container (Restvolumen wurde mit wassergefüllten Blutbeuteln aufgefüllt) eine Energiedosis von $30 \pm 1,5$ Gy erreicht (Rosen, 1993). Die Dosisverteilung wurde mit geeichten Alanindosimetern überprüft (Guidlines on gamma irradiation 1996, Bäumler & Latza 1999).

2.4 Lagerung von Erythrozytenkonzentraten

Die Untersuchungen umfassten insgesamt 192 EK, die in Gruppen zu je 12 eingeteilt waren und sich nach der Art der Herstellung (manuell, mittels Apherese: M), dem Lagerungsmedium (SAG-M, PAGGS-M, Adsol), der Leukozytendepletion (ungefiltert, gefiltert: F), sowie der Bestrahlung (unbestrahlt, bestrahlt: B) unterschieden (Tabelle 1). Während eines Zeitraums von bis zu 7 Wochen wurden wöchentlich die folgenden, den Metabolismus der Erythrozyten charakterisierenden Parameter bestimmt: Na^+ , K^+ , pH, Laktat, Glukose, 2,3-Diphosphoglyzerat (2,3-DPG), Adenosintriphosphat (ATP) sowie Blutbildparameter und die Hämolyserate. Die EK wurden nach vier verschiedenen Verfahren jeweils aus Human-Vollblut einer Einzelspende gewonnen.

Bezeichnung des EK	Lagerungsmedium	Herstellungsverfahren	Bestrahlung
EK in SAG-M	SAG-Mannitol	manuell	nein
EK in SAG-M, B	SAG-Mannitol	manuell	ja
EK in SAG-M, FMF	SAG-Mannitol	manuell, filtriert	nein
EK in SAG-M, F, BMF	SAG-Mannitol	manuell, filtriert	ja
EK in SAG-M, AF	SAG-Mannitol	Apherese, filtriert	nein
EK in SAG-M, AF, B	SAG-Mannitol	Apherese, filtriert	ja
EK in PAGGS-M	PAGGS-Mannitol	manuell	nein
EK in PAGGS-M, B	PAGGS-Mannitol	manuell	ja
EK in PAGGS-M, F	PAGGS-Mannitol	manuell, filtriert	nein
EK in PAGGS-M, F, B	PAGGS-Mannitol	manuell, filtriert	ja
EK in PAGGS-M, AF	PAGGS-Mannitol	Apherese, filtriert	nein
EK in PAGGS-M, AF, B	PAGGS-Mannitol	Apherese, filtriert	ja
EK in Adsol	Adsol	manuell	nein
EK in Adsol, B	Adsol	manuell	ja
EK in Adsol, F	Adsol	manuell, filtriert	nein
EK in Adsol, F, B	Adsol	manuell, filtriert	ja

Tabelle 1: *Hergestellte und untersuchte Erythrozytenkonzentrate*

Manuelle Spenden

Das Vollblut wurde innerhalb einer Stunde mit Hilfe des Vollblutfilters WBF1 (Pall GmbH, Dreieich) gefiltert oder verblieb ungefiltert bei Raumtemperatur und wurde anschließend zentrifugiert (Hettich Kühlzentrifuge Roto Silenta/RP; 5080 x g, 10 min). Danach wurden die Erythrozyten in die Beutel mit den Lagerungsmedien SAG-M, PAGGS-M (Biotrans GmbH, Dreieich) bzw. Adsol (Baxter GmbH, München) abgepresst.

Maschinelle Spenden

Mittels des Zellseparators MCS 3p bzw. MCS plus (RBCP-Protokoll, Haemonetics GmbH, München) wurden Erythrozytenkonzentrate hergestellt, die in die Lagerungsmedien SAG-M bzw. PAGGS-M resuspendiert wurden. Die resuspendierten Erythrozytenkonzentrate wurden ebenfalls mit Hilfe des Warmblutfilters WBF1 innerhalb einer Stunde gefiltert. Alle Erythrozytenkonzentrate wurden bei $4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.5 Lagerung von Thrombozytenkonzentraten

Für die Lagerungsuntersuchungen wurden 43 Thrombozytenkonzentrate verwendet. In Notfällen wurden viele dieser Konzentrate bereits vor Ablauf der zulässigen Lagerungsfrist transfundiert. Daher variierte gegen Ende der Lagerungszeit die Zahl der untersuchten Konzentrate. Für die Qualitätsuntersuchungen wurden 7 Thrombozytenkonzentrate hergestellt. Diese wurden bis zum Ende der zulässigen Lagerungszeit gelagert und dann untersucht. Die Thrombozytenkonzentrate wurden von freiwilligen, gesunden Spendern aus dem Spenderstamm des Instituts für Transfusionsmedizin der Charité durch Thrombapherese (MCS 3p bzw. MCS plus, Haemonetics GmbH) gewonnen. Die Flussrate betrug dabei 70 ml/min bei einer durchschnittlichen Dauer der Spende von einer Stunde. Den Konzentraten wurde ACD-A als Antikoagulanzen und Lagerungsmedium in einem Verhältnis von 1 : 10 beigegeben. Die Auswahl der Spender erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Der Einfluss von Pharmaka, Ernährung, Infektionen, Operationen und anderen Faktoren auf die hämostaseologische Funktion wurde ausgeschlossen. Die Konzentrate aus dem Mutterbeutel wurden über einen leukozytendepletierenden Filter (LRF 6™ H, PALL) zu gleichen Teilen in zwei Tochterbeutel überführt. Die Schwerkraft war dabei ausschließlich die treibende Kraft der Filtration. Die Dauer der Filtration betrug zwischen 4 und 6 Minuten. Vor der Filtration, nach der Filtration und im Falle der Bestrahlungsuntersuchungen nach der Bestrahlung wurden die Konzentrate circa 30 bis 60 Minuten auf einem Flachbett - Agitator (Baxter Healthcare Corporation) bis zur Probenentnahme gelagert. Der Agitationsmodus war horizontal und hatte eine Frequenz von 60/Minute. Der Flachbettagitator befand sich in einem Thrombozyteninkubator (Kryotec GmbH), der eine konstante Temperatur von +22 °C gewährleistete. Zwischen den einzelnen Probenentnahmen an den folgenden Untersuchungstagen lagerten die Thrombozytenkonzentrate ebenfalls unter diesen Bedingungen (Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer und Paul-Ehrlich-Institut 1996, 2000).

2.6 Lagerung von Frischplasma

Das Plasma wurde gemeinsam mit Erythrozyten oder Thrombozyten mittels der in Tabelle 2 angegebenen Apheresesysteme gewonnen. Zusätzlich wurde Plasma mittels Plasmapherese allein und aus manuellen Vollblutspenden gewonnen (Volumen der Plasmabeutel 250±10 ml). Die Lagerung der GFP erfolgte unter Standardblutbankbedingungen (Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer und Paul-Ehrlich-Institut 1996, 2000). Aus diesem Grund wurden jeweils 2 x 6 Plasmen von der Thrombozytapherese und jeweils 3 x 6 Plasmen von der Erythrozytapherese, Plasmapherese und der manuellen

Vollblutspende unter sterilen Bedingungen gemischt (gepoolt). Anschließend wurden die gemischten Plasmen wieder in 2 x 6 bzw. 3 x 6 normale Plasmabeutel überführt und eingefroren. Proben wurden sowohl jeweils von den Ausgangsbeuteln, als auch vom Poolbeutel entnommen. Von diesen Proben (n=12 und n=18, Pool: n=2 und n=3) wurden folgende Parameter bestimmt:

- Erythrozytenzahl (RBZ) und Leukozytenzahl(WBZ) mittels Zählung (Nageottekammer)
- Zahl der Thrombozyten (PLT) (Celldyn 3500; Abbott GmbH, Frankfurt a.M.);
- pH (37°C; AVL, Bad Homburg);
- Externes freies Hämoglobin (Hb_{ex}) (Hitachi, Boehringer Mannheim);
- Gesamtproteinkonzentration (Hitachi);
- Aktivität von Faktor VIII und Antithrombin III (STA, Boehringer Mannheim).

Das Plasma wurde spätestens 6 h nach der Spende innerhalb von 30 min Schock gefroren (Plasmafreezer KPE 24/80; Kryotec) und anschließend bei Temperaturen < -30°C gelagert. Abgesehen von der Zellzählung wurden alle Parameter alle 3 Monate bis zum 15. Lagerungsmonat nach dem Auftauen im Wasserbad innerhalb von 5 min bei 37°C bestimmt.

Art der Spende	Abkürzung	Apheresesystem	Stabilisator	Zahl der Spenden
GFP + Thrombozyten	GFP-T (MCS+)	MCS+ Haemonetics, München, LDPLP Protokoll	ACD-A	12
GFP + Thrombozyten	GFP-T (MCS 3p)	MCS 3p Haemonetics, A3p Protokoll	ACD-A	12
GFP + Thrombozyten	GFP-T (Spectra)	Cobe Spectra, Dreieich, 2 needle set, LRS Protokoll	ACD-A	12
GFP + Thrombozyten	GFP-T (AS 104)	AS104 Fresenius, Bad Homburg, Germany, PLT-5d Protokoll	ACD-A	12
2 GFP + RBZ	GFP-M	MCS+ Haemonetics, RBCP+ Protokoll	CPD-50	18
3 GFP	GFP-P	MCS 3p Haemonetics, GFP Protokoll	Nacitrate	18
GFP + RBC	GFP-B	nein	CPD	18

Tabelle 2: Übersicht über verwendete Apheresesysteme, Stabilisatoren u. Zahl der Spenden

2.7 Blutprodukte aus der Routineherstellung

Im Rahmen der routinemäßigen Qualitätskontrollen wurden am Institut für Transfusionsmedizin im Zeitraum von November 1998 bis März 2000 die in Tabelle 3 aufgeführten Produkte untersucht.

Arzneimittel	Zahl der Proben N
GFP	319
GFP-P	146
GFP-T	156
TK, LD	139
EK-PAGGS-M, F	164
EK-PAGGS-M, MF	213
EK-Adsol, F	190

Verwendete Abkürzungen:

EK: Erythrozytenkonzentrat; der Zusatz PAGGS-M bzw. Adsol verdeutlicht das Lagerungsmedium,
F: gefiltert
MF: Aphereseprodukt, gefiltert
TK, LD: Thrombozytapheresekonzentrat, Leukozyten depletiert
GFP: gefrorenes Frischplasma aus manueller Vollblutspende
GFP-P: gefrorenes Frischplasma aus Plasmapherese
GFP-T: gefrorenes Frischplasma aus Thrombozytapherese

Tabelle 3: Übersicht über die untersuchten Arzneimittel

Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden durchgängig als Box-Plots dargestellt (siehe Abbildung 1 und Abbildung 2). Der Kasten symbolisiert die Quantile (0,05; 0,95), d.h. innerhalb des Kastens befinden sich 90 % aller Werte. Die Striche stellen jeweils die Minimal- und Maximalwerte dar.

Elektrolyte und pH-Wert

Mit dem AVL 987-S Elektrolyt-Analysegerät (AVL Medical Instruments, Bad Homburg) wurden die Elektrolyte Natrium und Kalium und der pH-Wert der Blutproben bestimmt.

Adenosintriphosphat

Die ATP-Konzentration wurde mit dem Testbesteck von SIGMA DIAGNOSTICS® am Spektralphotometer U2000 (HITACHI) im gekoppelten optischen Test bestimmt.

2,3-Diphosphoglyzerat-Gehalt

Das 2,3-DPG wurde im gekoppelten optischen Test (Boehringer Testbesteck) nach Ablauf der katalysierten Reaktionen am Spektralphotometer U 2000 (HITACHI) bestimmt.

Laktat

Laktat wurde mit einem enzymatischen Farbttest (LACTAT PAP, Analyticon GmbH) am Photometer (Hitachi 747) gemessen.

Glucose

Zur Anwendung bei der Glucosebestimmung kam die Hexokinase-Methode, bei der im gekoppelten optischen Test die Extinktion am Photometer (Hitachi 747) gemessen wurde (Testbesteck Gluco-quant Glucose, (Boehringer Mannheim)).

Freies Hämoglobin und Hämolyserate

Zur Bestimmung des Plasma-Hämoglobins wurden die Absorptionsmaxima des freien Hämoglobins bei einer Wellenlänge von 540 nm nach Zugabe von Transformationslösung zum Überstand der Blutprobe gemessen. Anschließend erfolgte die Berechnung der Hämolyserate aus dem ermittelten Überstand-Hb durch Bezug auf den Gesamt-Hb und Hk der zugehörigen Probe.

Kleines Blutbild

Die Messung der Blutbildparameter (Hb, Hk, Erythrozyten, MCV, MCH, MCHC, Leukozyten, Thrombozyten) erfolgte mit dem H1/H2-System (Technicon) oder dem Celldyn 3500 (Abbott GmbH). Die Leukozytenzahl nach Filtration wurde durch Zählung in der Nageotte-Kammer im Phasenkontrast nach Auflösung der Erythrozyten durch ein oberflächenaktives Glykosid bestimmt.

Induzierte Thrombozytenaggregation

Bei Verwendung von Vollblut wurde das benötigte Probenvolumen (5 ml) in einer mit Citrat gefüllten Sarstedt-Monovette aufgefangen. Zur Herstellung des benötigten plättchenreichen Plasmas wurde 5 Minuten bei 250 g zentrifugiert. Die dadurch erreichte Thrombozyten-Zellzahl lag im Bereich von 250 000 bis 300 000 / μ l. Die Zellzahl wurde mit heterologem, ABO-kompatiblen Plasma eingestellt. Die Eichung des Aggregometers vor jeder Messung erfolgte ebenfalls mit diesem Plasma. Die Aggregationsmessungen wurden am Mehrkanalaggregometer (PAP-4, BioDATA, USA) durchgeführt. Als aggregationsauslösende Substanzen wurden benutzt:

- *ADP*: ADP als Lyophilisat (mölab) rekonstituiert mit 0,5 ml bidestilliertem Wasser (Konzentration 2×10^{-4} M).
- *ADP_{low}*: ADP als Lyophilisat (mölab) rekonstituiert mit 5 ml bidestilliertem Wasser (Konzentration 2×10^{-5} M).
- *Ristocetin*: Lyophilisiertes Ristocetin (PAESEL + LOREI GmbH & Co) rekonstituiert mit 0,5 ml NaCl (Endkonzentration 10 mg/ml).

- *Collagen*: Lyophilisiertes Collagen (mölab) wurde in 0,5 ml bidestilliertem Wasser rekonstituiert (Endkonzentration 1,9 mg/ml).

Zur Aggregationsmessung wurden je 200 µl Probe und die Magnetrührer in die Meßküvetten gegeben und darin im Aggregometer circa 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Auf 200 µl Probe wurden dann 20 µl der jeweiligen aggregationsauslösenden Substanz gegeben. Aggregation wurde definiert als prozentuale Änderung der optischen Dichte nach Zugabe der aggregationsauslösenden Substanz.

Durchflusszytometrische Bestimmung von Aktivierungsmarkern der Thrombozyten

Die Expression des alphagranulären Membranproteins GMP-140 (CD 62a, Synonym: P-Selectin) wurde am Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson, USA) bestimmt. Hierzu wurden 60 µl Thrombozytenkonzentrat in eine mit 1 ml EDTA/Formalin (1%) gefüllte Monovette gegeben, um die geforderte Zahl von 1 Million Zellen pro ml zu erreichen und gleichzeitig die Zellen zu fixieren.

Vorbereitende Untersuchungen ergaben, dass diese Methode der Fixation der mit einer Spezialpufferfixation (Spezialpuffer II, pH = 7,4; KH₂PO₄ 9,07 g, Na₂HPO₄ x 12 H₂O 9,47 g, EDTA-Na 4,36 g, Formaldehydlösung 10 g, Aqua ad 1000 ml) gleichwertig ist.

Die Spezialpufferfixation kam bei der Untersuchung von Vollblut zu den Zeitpunkten vor der Spende und nach der Spende zur Anwendung. Dabei wurden 300 µl Vollblut mit 1 ml des Spezialpuffers fixiert.

Nach vorsichtiger Resuspension wurden 10 µl des jeweiligen Gemisches entnommen und für 20 Minuten mit je 10 µl der monoklonalen Antikörper anti-CD 42 a (GP IX) und anti-CD 62a (GMP-140) bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde mit 1 ml PBS (physiologischer Phosphatpuffer) aufgefüllt und die Probe vermessen.

Nachweis von Interleukin 1 Rezeptor Antagonist (IL-1RA) im Überstand von EK's und in lysierten Erythrozyten

Die Überstände der Buffy coat-armen EK's und der gefilterten EK's wurden zu jedem Zeitpunkt der Studie (vor Lagerung, Woche 1 bis 7 der Lagerung) abgenommen und bei -70°C für die IL-1RA Bestimmung eingefroren. Zusätzlich wurden zur Bestimmung der Gesamtmenge von IL-1RA (frei und zell-assoziiert) in den EK's die Erythrozyten eingefroren (-70°C für 60 min.) und aufgetaut (37°C für 15 min.), um eine vollständige Lyse

durchzuführen. Nach der Zentrifugation der lysierten Erythrozyten wurde der Überstand ebenfalls bei -70°C eingefroren. Da bei der Zell-Lyse die intrazelluläre Flüssigkeit freigesetzt wurde, mussten alle IL-1RA Werte zur Korrektur mit dem Faktor $1/(1-\text{Hämatokrit})$ multipliziert werden, um die Ergebnisse vergleichbar zu machen. Die IL-1RA Bestimmungen wurden mit dem Quantikine™ IL-1RA ELISA Kit (DPC Biermann, Bad Nauheim), wie vom Hersteller vorgeschrieben, durchgeführt.

2.8 Statistik

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Programm SPSS für Windows 7.5.3 auf einem PC. Zur explorativen Datenanalyse wurden für die Leukozyten- und Thrombozyten-Filtrationseffizienz, die Leukozyten-Kontamination und die Filtrationsdauer der Mittelwert und die Standardabweichung in Abhängigkeit vom Filtrationszeitpunkt berechnet. Zusätzlich wurden Box-plots angefertigt: Box-Plots zeigen den Interquartilbereich, der die mittleren 50% der Einzelwerte enthält als Kasten ("box") sowie den Median als Linie innerhalb der Box. Die Linien ober- und unterhalb der Box stellen die Spannweite der Werte ohne Ausreißer dar (Sachs, 1984). Ausreißer sind als Werte definiert, die mehr als das 1,5-fache des Interquartilbereiches ober- bzw. unterhalb des Interquartilbereiches liegen. Sie sind in Form von Rauten dargestellt. Zur konfirmativen Datenanalyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse für den unabhängigen Faktor "Filtrationszeitpunkt" durchgeführt. Die Nullhypothese eines fehlenden Einflusses des Filtrationszeitpunktes wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ verworfen. Bei einem signifikanten Einfluss wurden Einzelvergleiche zwischen den einzelnen Filtrationszeitpunkten mit dem Scheffé-Test vorgenommen (Sachs, 1984).

Die Ergebnisse, mit Ausnahme der Zytokinuntersuchungen, wurden als Mittelwerte \pm SD angegeben (Sachs 1984). Die statistische Prüfung erfolgte mittels Varianzanalyse (signifikant für $p < 0,05$). Als Korrelationsmaß diente der Bravaische Korrelationskoeffizient nach Prüfung auf Normalverteilung der Merkmale (signifikant für $p < 0,01$). Die Ergebnisse der Zytokinuntersuchungen wurden als Mittelwert \pm des Standardfehlers dargestellt (SEM). Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der SPSS™ Software (SPSS Inc.) durchgeführt. Signifikante Veränderungen während der Lagerungszeit wurden mit dem Friedman's Test (zeitabhängig für alle Zeitpunkte) und dem Wilcoxon Test für gepaarte Stichproben (gegenüber den Werten vor Lagerung) bestimmt (Sachs 1984). Für jeden Zeitpunkt wurde der Vergleich der Buffy coat-armen und der gefilterten EK's mit dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt (Sachs 1984).