

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Audits und Akkreditierung**

Nach erfolgreicher Absolvierung aller Entwicklungs- und Prüfungsphasen fand das erste Audit am 04. 02. 1997 durch das CAP statt. Die Inspektoren prüften gemäß ihren Richtlinien und Vorgaben alle Bereiche des Institutes, entdeckte Mängel wurden schriftlich festgehalten und dafür mussten Lösungsvorschläge bis zur Korrektur bzw. umgehenden Abstellung der Mängel vorgenommen werden. Die Korrekturen wurden in die USA gefaxt und nach der Mängelbeseitigung erteilte das CAP das Zertifikat über die erfolgreiche Akkreditierung.

Bei dem ersten Audit durch CAP im Februar 1997 fanden sich nur wenige Mängel, davon wurden nur 3 der Phase II als schwerwiegend aufgeführt:

- 1) Fehlende Testung auf HTLV I/II bei allen Spendern
- 2) Bauliche Mängel im Spenderraum
- 3) Keine ausreichende Sicherung der Spenderakten

Die Testung auf HTLV I/II ist entsprechend den Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion (Hämotherapie) bei Spendern in Deutschland - im Gegensatz zu den USA – aus epidemiologischen Gründen nicht vorgeschrieben. Daher wurde von Seiten der CAP-Inspektoren zugestimmt, weiterhin auf eine HTLV I/II-Testung der Blutspender im Institut für Transfusionsmedizin der Charité zu verzichten.

Die Mängel 2 und 3 wurden abgestellt. Dies war die letzte notwendige Voraussetzung für die Akkreditierung. Die leichten Phase-I-Mängel, z.B. die Installation von Augenduschen in den Laboratorien, Tragen von Schutzkleidung aller Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter in den Laboratorien, kontinuierliche Temperaturdokumentation, wurden zeitnah behoben.

Bei dem zweiten Audit im März 1999 wurden 4 Phase-II-Mängel festgestellt, von denen 2 unmittelbar vor Ort gelöst wurden. Zum einen wurde der Fragebogen für Blutspender erweitert – erweiterte Frage nach der Applikation von Immunglobulinen innerhalb der letzten 12 Monate – und zum anderen erfolgte die ergänzende Auslage von weiterem Informationsmaterial über das Blutspenden für alle Blutspender. Die beiden anderen Phase-II-Mängel (die Unterschrift des Arztes, der eine Blutentnahme durchführt, auf der Außenseite des Blutprobenbehältnisses sowie die Identifizierung aller Patienten mittels eines Armbandes, auf dem der Name und die Registrierungsnummer aufgedruckt ist) wurden dem

Senat für Gesundheit in Berlin und der Klinikumsleitung gemeldet. Diese beiden Mängel konnten nicht abgestellt werden, weil der Senat für Gesundheit in Berlin und die Klinikumsleitung sich nicht im Stande sahen, diese beiden Identifikationsmaßnahmen anzuordnen.

Bei dem dritten Audit im März 2001 fanden sich 3 Phase-II-Mängel, die allesamt behoben wurden. Die SOP's wurden mit den aktuellen Literaturangaben versehen. Des Weiteren wurde ein einheitlicher Erhebungsbogen bzgl. der Nebenwirkungen mit Angabe der klinischen Kriterien im gesamten Klinikum etabliert. Als letztes wurde die Forderung nach einer einheitlichen schriftlichen Dokumentation der von den Ärzten durchgeführten ABO-bed-side-Tests in jeder Krankenakte erfüllt.

Bei dem vierten Audit im März 2003 wurde die CAP-Akkreditierung ohne Phase-II-Mängel auf das Virchow-Klinikum, Campus Charité Virchow (CVK), erweitert. Nach der ersten erfolgten Akkreditierung wurde die Qualität der hergestellten Blutprodukte auf wissenschaftlicher Basis zur weiteren Optimierung analysiert.

### **3.2 Leukozytendepletion von Erythrozytenkonzentraten**

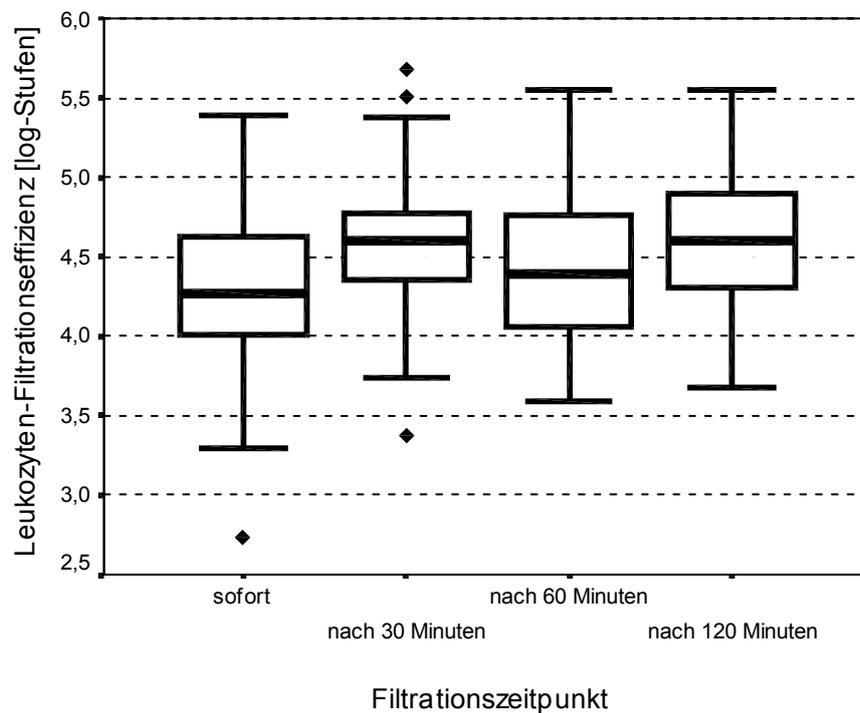
Die Leukozyten-Filtrationseffizienz ergab unabhängig vom Filtrationszeitpunkt im Mittel vier  $\log_{10}$ -Stufen. Allerdings wiesen die Werte für die Filtration sofort nach Herstellung eine größere Streuung auf (Tabelle 4, Abbildung 1). Als Ausreißer fand sich bei einer Konserve eine minimale Filtrationseffizienz von 2,7  $\log_{10}$ -Stufen. In der Varianzanalyse unterschieden sich die Zeitpunkte signifikant ( $p < 0,001$ ). Die Einzelvergleiche zeigten eine schlechtere Leukozyten-Filtrationseffizienz bei sofortiger Filtration im Vergleich zur Filtration nach 30 bzw. 120 Minuten.

In Abbildung 2 und Tabelle 4 ist die Leukozyten-Kontamination dargestellt: Die Werte lagen im Mittel deutlich unter  $1 \times 10^6$ /Transfusionseinheit. Wie nach den Ergebnissen der Leukozyten-Filtrationseffizienz zu erwarten, wiesen die sofort nach Herstellung gefilterten Vollblutkonserven eine größere Streuung der Leukozyten-Kontamination auf. Als Ausreißer lag bei einer sofort gefilterten Vollblutkonserve die Leukozyten-Kontamination bei  $5,0 \times 10^6$ . Die Werte unterschieden sich in der Varianzanalyse signifikant ( $p = 0,018$ ), in den Einzelvergleichen fand sich lediglich zwischen sofortiger Filtration und Filtration nach 120 Minuten ein klarer Unterschied.

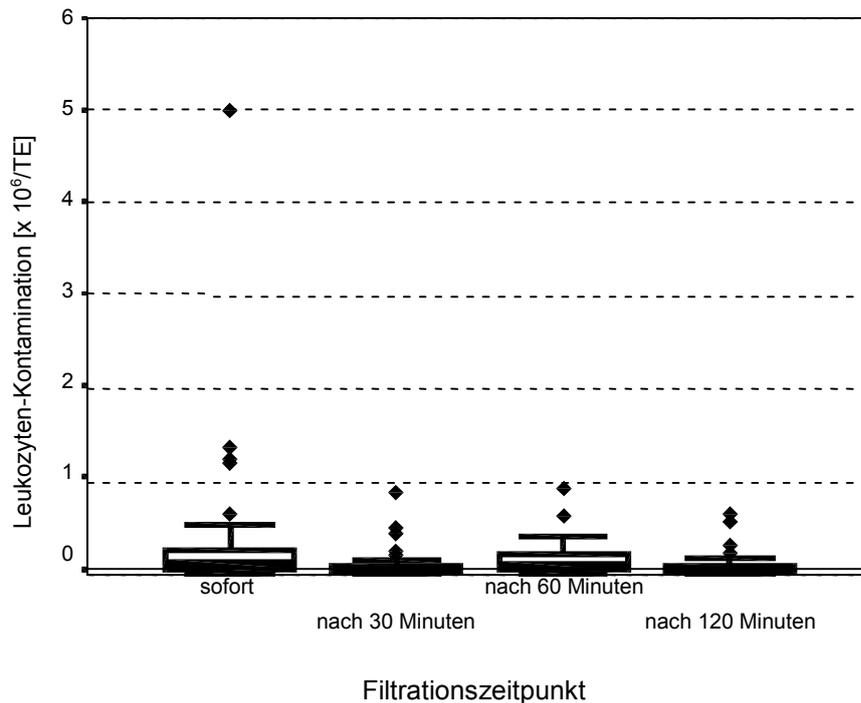
Die Thrombozyten-Filtrationseffizienz ist in näherer Eingrenzung in Tabelle 4 dargestellt. Sie betrug im Mittel mehr als 2  $\log_{10}$ -Stufen. Die Werte unterschieden sich in der Varianzanalyse signifikant ( $p = 0,005$ ). Tabelle 4 zeigt des Weiteren die Werte für die Filtrationsdauer, die sich nicht deutlich zwischen den Gruppen unterschied ( $p = 0,221$ ).

		Filtrationszeitpunkt			
		sofort nach Herstellung	30 Minuten nach Herstellung	60 Minuten nach Herstellung	120 Minuten nach Herstellung
Leukozyten- Filtrationseffizienz	$\log_{10}$	4,3 $\pm$ 0,5	4,6 $\pm$ 0,4	4,4 $\pm$ 0,5	4,6 $\pm$ 0,4
Leukozyten- Kontamination	$10^6/TE$	0,32 $\pm$ 0,74	0,10 $\pm$ 0,15	0,16 $\pm$ 0,17	0,09 $\pm$ 0,12
Thrombozyten- Filtrationseffizienz	$\log_{10}$	2,2 $\pm$ 0,6	2,3 $\pm$ 0,5	2,6 $\pm$ 0,6	2,3 $\pm$ 0,6
Filtrationsdauer	Minuten	8,7 $\pm$ 5,2	10,0 $\pm$ 4,7	9,1 $\pm$ 3,6	10,8 $\pm$ 7,4

**Tabelle 4:** Mittelwert und Standardabweichung der Leukozyten-Filtrationseffizienz, Leukozyten-Kontamination, Thrombozyten-Filtrationseffizienz und Filtrationsdauer in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Filtration nach Herstellung ( $n = 50$  für jeden Zeitpunkt)



**Abbildung 1:** Box-Plot für die Leukozyten-Filtrationseffizienz [log-Stufen] in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Filtration nach Herstellung ( $n = 50$  für jeden Zeitpunkt)



**Abbildung 2:** Box-Plot für die Leukozyten-Kontamination [ $10^6$ /Transfusionseinheit] in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Filtration nach Herstellung ( $n = 50$  für jeden Zeitpunkt)

### 3.3 Sterilitätsuntersuchungen

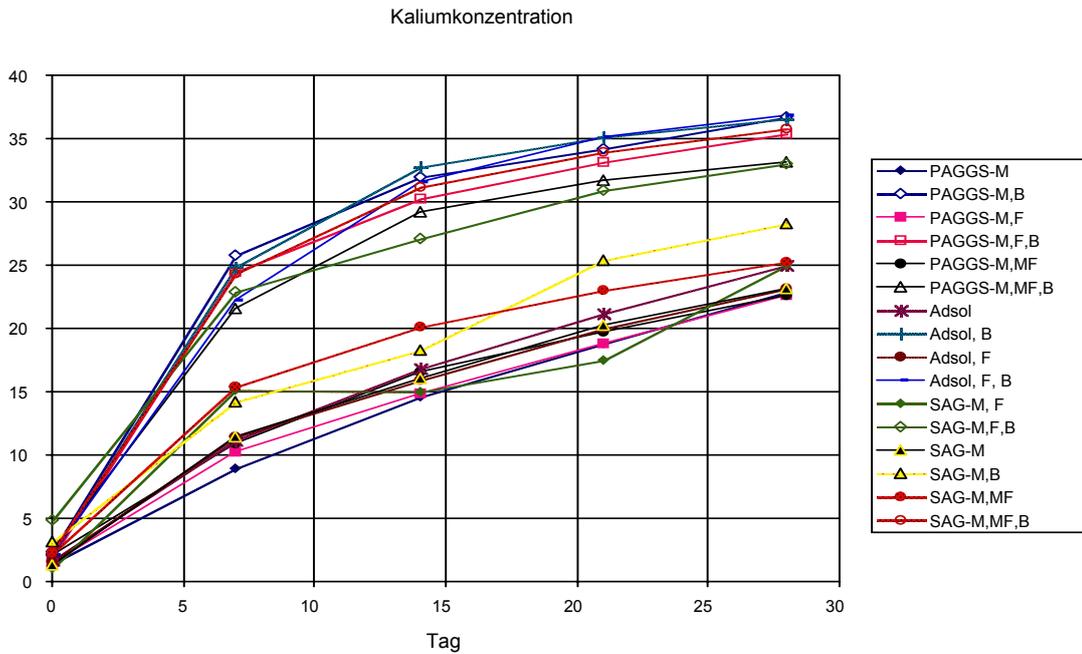
Im Zeitraum vom 01.06.1997 bis zum 28.02.1999 wurden an insgesamt 223 Erythrozytenkonzentraten am Ende der Lagerungszeit nach 39 bis 45 Tagen eine Sterilitätstestung vorgenommen. In keinem Erythrozytenkonzentrat konnte ein positiver Keimnachweis geführt werden.

### 3.4 Lagerungsuntersuchungen unbestrahlter u. bestrahlter Erythrozytenkonzentrate

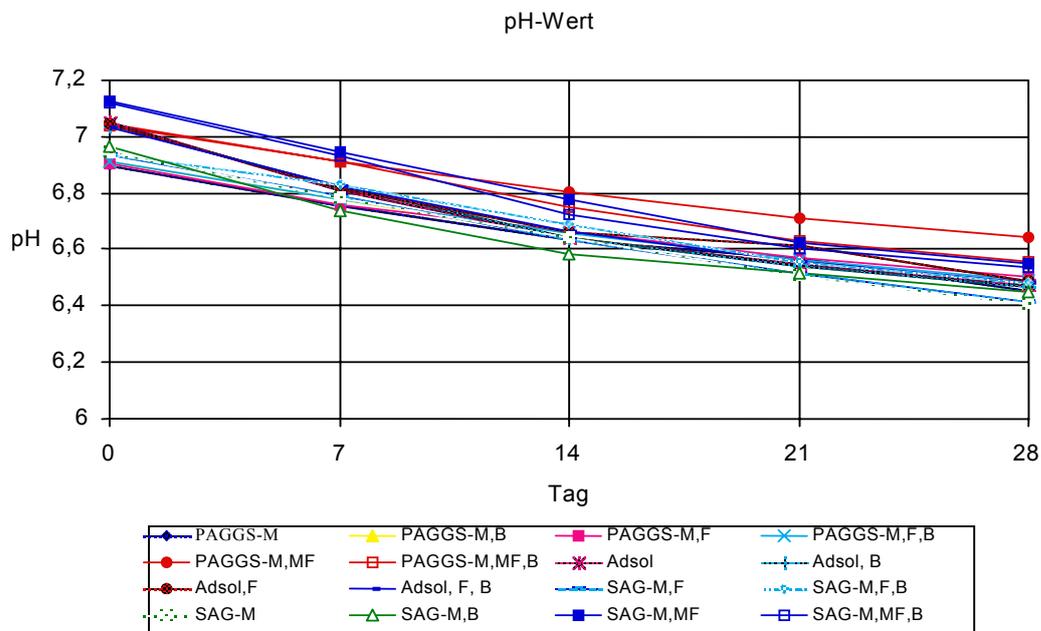
Bei den manuell hergestellten EK betragen die Leukozytenzahlen vor der Filtration im Mittel  $(5,6 \pm 2,0) \times 10^9$  Leukozyten/l und bei den mittels Apherese hergestellten EK im Mittel  $(4,2 \pm 1,5) \times 10^9$  Leukozyten/l. In allen leukozytendepletierten EK war die Zahl der Leukozyten um den Faktor  $4 \log_{10}$  gegenüber den Ausgangswerten auf im Mittel  $(2,5 \pm 1,3) \times 10^5$  Leukozyten/l bei den manuell hergestellten EK und auf im Mittel  $(1,0 \pm 0,8) \times 10^5$  reduziert. Die mittlere Filtrationsdauer betrug  $(8 \pm 7)$  min.

### 3.4.1 Elektrolyte und pH

Die  $K^+$ -Ionenkonzentration im Überstand der bestrahlten EK war vom ersten Tag nach der Bestrahlung an signifikant höher als bei den unbestrahlten EK und erreichte nach 4 Wochen Lagerung Werte von  $35 \pm 5$  mmol/l, wobei die Unterschiede zwischen den EK in den verschiedenen Lagerungsmedien vernachlässigbar waren (Abbildung 3). Die Natriumionenkonzentration im Überstand der EK zeigte erwartungsgemäß eine kontinuierliche Abnahme, die mit der Kaliumzunahme korrelierte ( $r^2 = 0,92$ ,  $p = 0,0001$ ) und bei den bestrahlten EK ( $r^2 = 0,96$ ,  $p = 0,0001$ ) am stärksten ausgeprägt war ( $r^2 =$  Korrelationskoeffizient,  $p =$  Wahrscheinlichkeit). Im Verlauf der Lagerung der EK sank der pH-Wert kontinuierlich von anfangs  $7,03 \pm 0,05$  bei den manuell hergestellten EK in Adsol und von anfangs  $6,90 \pm 0,04$  bei den manuell hergestellten EK in *SAG-M* bzw. *PAGGS-M* auf Werte von  $6,40 \pm 0,05$  am 28. Lagerungstag unabhängig vom Lagerungsmedium. Größere Unterschiede zwischen den bestrahlten und unbestrahlten EK wurden unabhängig vom Lagerungsmedium nicht festgestellt. Die maschinell hergestellten EK wiesen sowohl für die EK in *SAG-M* als auch in *PAGGS-M* während des gesamten Untersuchungszeitraumes höhere pH-Werte gegenüber den manuell hergestellten EK in *SAG-M* bzw. *PAGGS-M* auf. Zwischen den bestrahlten und unbestrahlten EK konnten keine deutlichen Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 4).



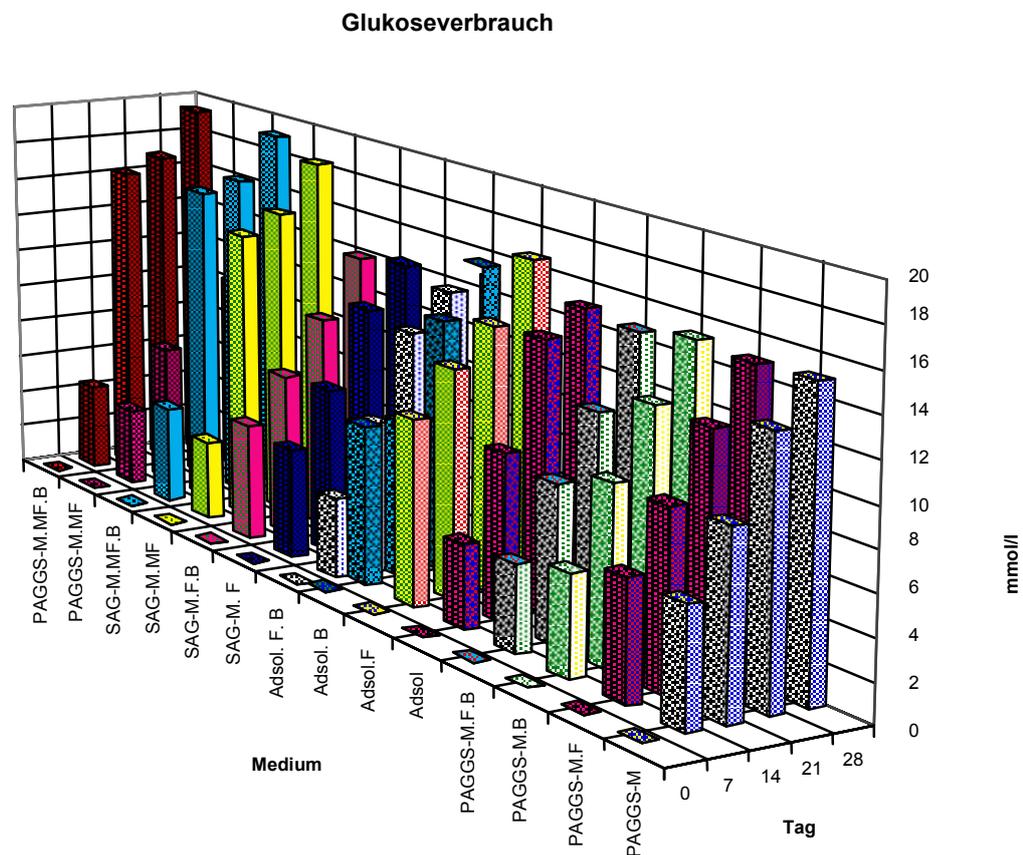
**Abbildung 3:** Mittelwerte der Kaliumionenkonzentrationen im Überstand der gelagerten bestrahlten und unbestrahlten Erythrozytenkonzentrate (jeweils  $N=12$ ). Die Zusätze F bzw. B hinter den Lagerungsmedien SAG-M, PAGGS-M bzw. Adsol bedeuten filtriert bzw. bestrahlt (30 Gy). Ohne Zusatz bedeutet unbestrahlt. Der Kaliumkonzentrationsanstieg ist bei den bestrahlten Erythrozyten in der 1. Lagerungswoche am größten und unterscheidet sich signifikant von dem bei den unbestrahlten EK's. Die SD betrug im Mittel 5 %.



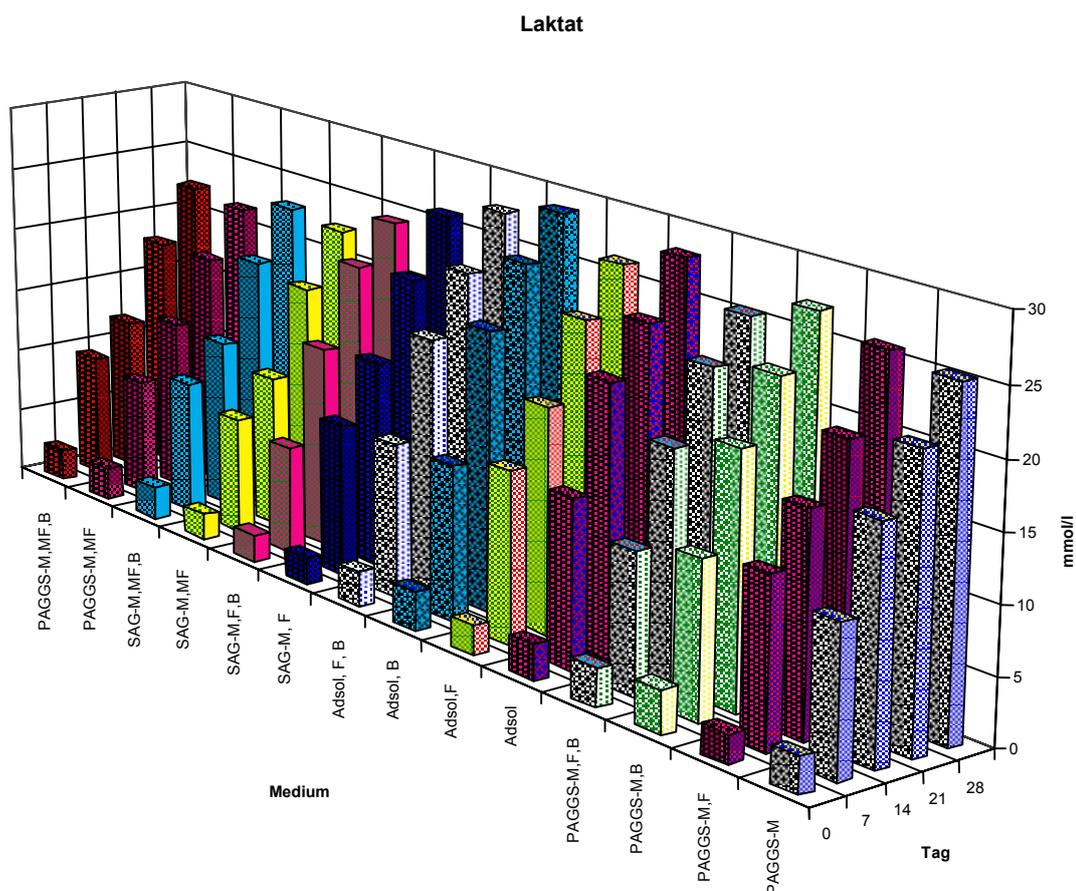
**Abbildung 4:** Mittelwerte des pH bei bestrahlten und unbestrahlten EK's (übrige Zusätze wie in Abbildung 3). Die pH-Werte der bestrahlten und unbestrahlten EK unterschieden sich an den Messtagen nicht signifikant.

### 3.4.2 Laktat und Glukose

Die Glykolyse im Erythrozyten, charakterisiert durch die Laktatkonzentration und den Glukoseverbrauch im Überstand, wurde durch die Bestrahlung nicht wesentlich beeinflusst (Abbildung 5). Bei den gefilterten, in Adsol gelagerten Erythrozyten war im Vergleich zu den unfiltrierten EK ein niedrigerer Glukoseverbrauch feststellbar, ansonsten hatte die Art des Lagerungsmediums, sowie die Leukozytendepletion auf die Glykolyse keinen Einfluss. Bemerkenswert ist jedoch, dass die maschinell hergestellten EK bis zur 4. Lagerungswoche niedrigere Laktatkonzentrationen aufwiesen, was mit einem höheren pH-Wert ( $r^2 = 0,94$ ,  $p < 0,001$ ) und einem geringeren Glukoseverbrauch ( $r^2 = 0,90$ ,  $p < 0,001$ ) korrelierte (Abbildung 6).



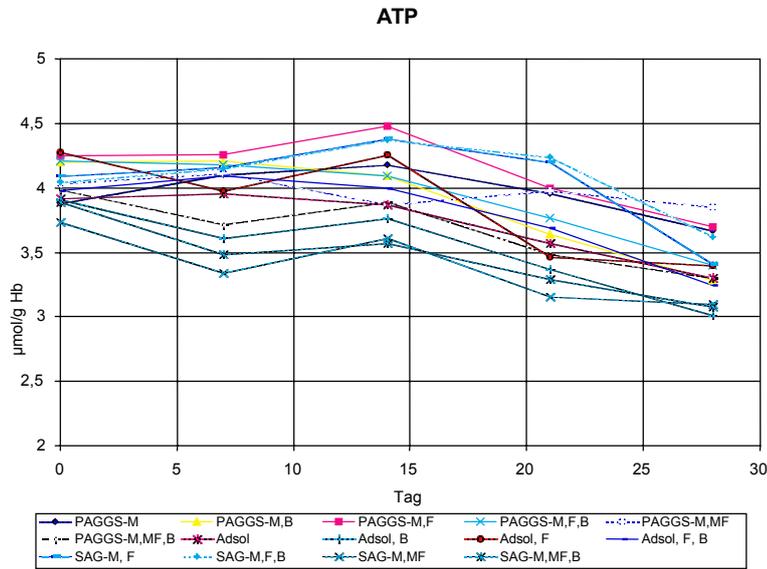
**Abbildung 5:** Einfluss der Lagerungsdauer, Leukozytendepletion, Bestrahlung und des Lagerungsmediums auf den Glukoseverbrauch der Erythrozyten in Erythrozytenkonzentraten. Dargestellt sind die Mittelwerte (jeweils  $N=12$ ). Die Standardabweichungen betragen im Mittel 10 % vom Mittelwert.



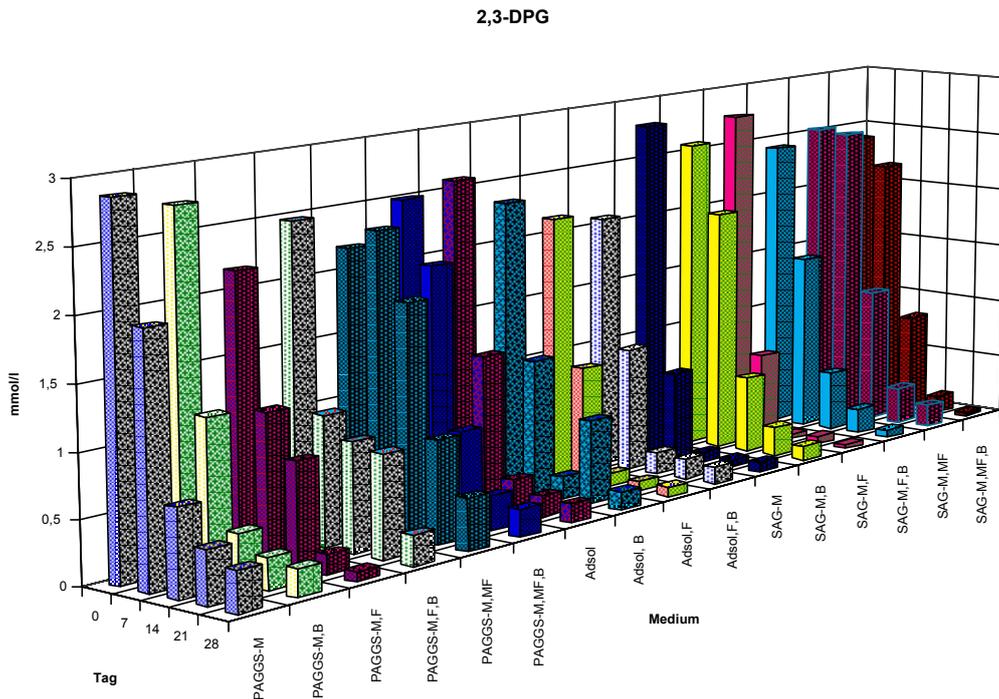
**Abbildung 6:** Einfluss der Lagerungsdauer, Leukozytendepletion, Bestrahlung und des Lagerungsmediums auf die Laktatproduktion der Erythrozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte (jeweils  $N=12$ ). Die Standardabweichungen betragen im Mittel 10% vom Mittelwert.

### 3.4.3 ATP (Adenosintriphosphat) und 2,3-DPG (2,3-Diphosphoglyceride-Acid)

Die ATP-Konzentration in den Erythrozyten (Abbildung 7) änderte sich bis zur 4. Lagerungswoche nicht wesentlich und nahm dann bis zum Ende der für die jeweiligen Lagerungsmedien zulässigen Lagerungszeit kontinuierlich ab. Die ATP-Konzentrationen der bestrahlten Erythrozyten unterschieden sich dabei nicht von denen in unbestrahlten EK unabhängig davon, in welchem Medium die EK gelagert wurden. Es wurden auch keine bedeutsamen Unterschiede zwischen gefilterten und ungefilterten EK festgestellt.



**Abbildung 7:** Einfluss der Lagerungsdauer, Leukozytendepletion, Bestrahlung und des Lagerungsmediums auf die ATP-Konzentration der Erythrozyten in EK's. Dargestellt sind die Mittelwerte (jeweils N=12). Die Standardabweichung betrug im Mittel 10 % vom Mittelwert.



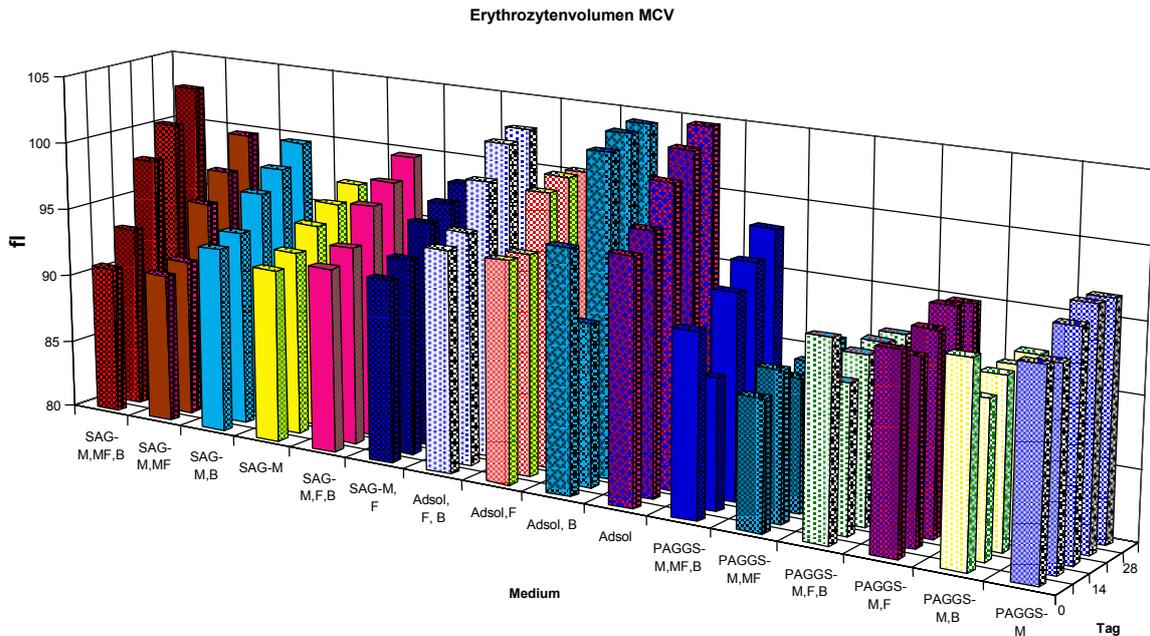
**Abbildung 8:** Einfluss der Lagerungsdauer, Leukozytendepletion, Bestrahlung und des Lagerungsmediums auf die 2,3-DPG-Konzentration der Erythrozyten in EK's. Dargestellt sind die Mittelwerte (jeweils N=12). Die Standardabweichungen betragen im Mittel 15 % vom Mittelwert.

Der Verlauf der 2,3-DPG-Konzentration in den Erythrozyten (Abbildung 8) zeigte in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer die bekannte Verarmung der Zellen an 2,3-DPG. Bereits nach einer Lagerungswoche waren die Werte unabhängig vom Lagerungsmedium deutlich gegenüber den Ausgangswerten erniedrigt. Unterschiede zwischen den bestrahlten und unbestrahlten EK konnten nur für die in SAG-M gelagerten Erythrozyten bis zur dritten Lagerungswoche festgestellt werden. Die mittels Apherese hergestellten und filtrierte EK's in SAG-M bzw. PAGGS-M wiesen einen geringeren Abfall der 2,3-DPG-Konzentration auf, als die manuell hergestellten und filtrierte EK in allen untersuchten Lagerungsmedien.

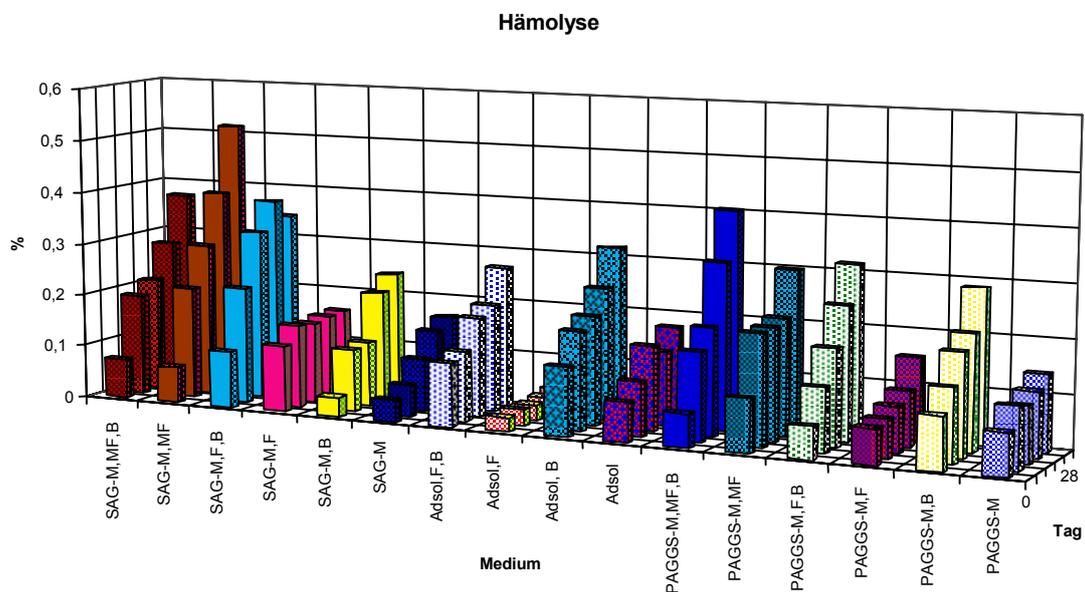
#### **3.4.4 Blutbild und Hämolyserate**

Bei den Erythrozytenindizes nahm das mittlere Erythrozytenvolumen (MCV) in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer und dem Medium unterschiedlich stark zu (Abbildung 9). Die Bestrahlung der EK führte bei den mittels Apherese hergestellten EK zu einer zusätzlichen leichten Schwellung der Erythrozyten. Bei den in SAG-M gelagerten EK waren die MCV-Werte im Vergleich zu denen bei den manuell hergestellten EK in SAG-M ab dem 14. Lagerungstag höher. Bei den in PAGGS-M gelagerten EK traf dies nur für die bestrahlten EK zu. Bei den manuell hergestellten EK waren keine bedeutsamen Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten EK in SAG-M bzw. Adsol erkennbar. Die MCV-Werte der bestrahlten Erythrozyten der EK in PAGGS-M waren ab der 1. Lagerungswoche niedriger als die Ausgangswerte. Dann nahmen die MCV-Werte bis zum Ende der Lagerung kontinuierlich zu. Die Hämolyserate erreichte bei den unbestrahlten manuell hergestellten EK unabhängig vom Lagerungsmedium am Ende der jeweiligen Haltbarkeitsdauer  $0,3 \pm 0,1$  %. Während es bei den in SAG-M bzw. PAGGS-M gelagerten EK keine wesentlichen Unterschiede zwischen ungefilterten und gefilterten EK gab, war die Hämolyserate bei den gefilterten EK in Adsol ab der 2. Lagerungswoche signifikant niedriger. Die mittels Apherese hergestellten EK wiesen im Vergleich zu den manuell hergestellten gefilterten EK ab dem 7. Lagerungstag höhere Hämolysraten auf (Abbildung 10).

Die bestrahlten EK zeigten unabhängig von der Filtration eine höhere Hämolyserate im Vergleich zu den unbestrahlten EK im jeweiligen Lagerungsmedium ab der 2. Lagerungswoche. Diese Werte blieben aber in allen Fällen auch nach der 4. Lagerungswoche deutlich unter dem nach den Richtlinien (Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer und Paul-Ehrlich-Institut 1996, 2000) zulässigen Grenzwert von 0,8 %.



**Abbildung 9:** Verlauf der Mittelwerte der Erythrozytenvolumina in Abhängigkeit von Lagerungsdauer, Leukozytendepletion und Lagerungsmedien (SD im Mittel 3 %). Die in PAGGS-M gelagerten Erythrozyten wiesen generell einen signifikant geringeren Anstieg des MCV im Vergleich mit den in SAG-M bzw. Adsol gelagerten Erythrozyten auf.



**Abbildung 10:** Mittelwerte der Hämolyseraten von EK's in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer, der Leukozytendepletion, der Bestrahlung und den Lagerungsmedien. Die mittlere Standardabweichung betrug 20 %. Da Hämolyserate und MCV in enger Beziehung zueinander zu stehen scheinen, wurde die Korrelation des auf den Ausgangswert bezogenen MCV und der Hämolyserate im jeweiligen Lagerungsmedium über den zulässigen Lagerungszeitpunkt bestimmt (Tabelle 5).

Für alle EK wurde eine lineare Abhängigkeit zwischen dem relativen MCV und der Hämolyserate gefunden. Der Anstieg der Hämolyserate infolge des zunehmenden MCV im Verlauf der Lagerung war bei den manuell hergestellten und bestrahlten EK in PAGGS-M bzw. SAG-M doppelt so groß wie bei den unbestrahlten EK, wobei die Filtration keinen bedeutsamen Einfluss zeigte. Bei den in Adsol gelagerten EK unterschieden sich die Anstiege der ungefilterten EK (unbestrahlt und bestrahlt) von denen der bestrahlten gefilterten EK nicht wesentlich. Der Anstieg der Hämolyserate der bestrahlten und gefilterten EK war niedriger im Vergleich zu den übrigen EK in Adsol.

Die mittels Apherese hergestellten EK wiesen bezüglich des Bestrahlungseinflusses keinen einheitlichen Verlauf auf. Die Anstiege unterschieden sich bei den in SAG-M gelagerten EK nicht deutlich, wogegen der Anstieg der Hämolyserate bei den in PAGGS-M gelagerten bestrahlten EK messbar höher war als bei den unbestrahlten EK.

Bezeichnung des EK	Anstieg	Korrelationskoeffizient $r^2$	Wahrscheinlichkeit ( $p <$ )
EK in SAG-M	0,018	0,972	0,0001
EK in SAG-M, B	0,034	0,878	0,01
EK in SAG-M, F	0,017	0,717	0,01
EK in SAG-M, F, B	0,037	0,908	0,01
EK in SAG-M, MF	0,055	0,884	0,001
EK in SAG-M, MF, B	0,036	0,816	0,01
EK in PAGGS-M	0,031	0,897	0,0005
EK in PAGGS-M, B*	0,080	0,919	0,001
EK in PAGGS-M, F	0,038	0,928	0,0001
EK in PAGGS-M, F, B*	0,076	0,878	0,01
EK in PAGGS-M, MF	0,042	0,706	0,01
EK in PAGGS-M, MF, B*	0,072	0,955	0,005
EK in Adsol	0,018	0,876	0,001
EK in Adsol, B	0,020	0,818	0,005
EK in Adsol, F	0,004	0,849	0,001
EK in Adsol, F, B	0,021	0,919	0,001

**Tabelle 5:** Korrelationskoeffizienten und Signifikanzen der Regressionsanalyse für die funktionelle Abhängigkeit des relativen MCV und der Hämolyserate. Bei den mit \* gekennzeichneten EK wurden nur die Werte ab dem 7. Lagerungstag berücksichtigt.

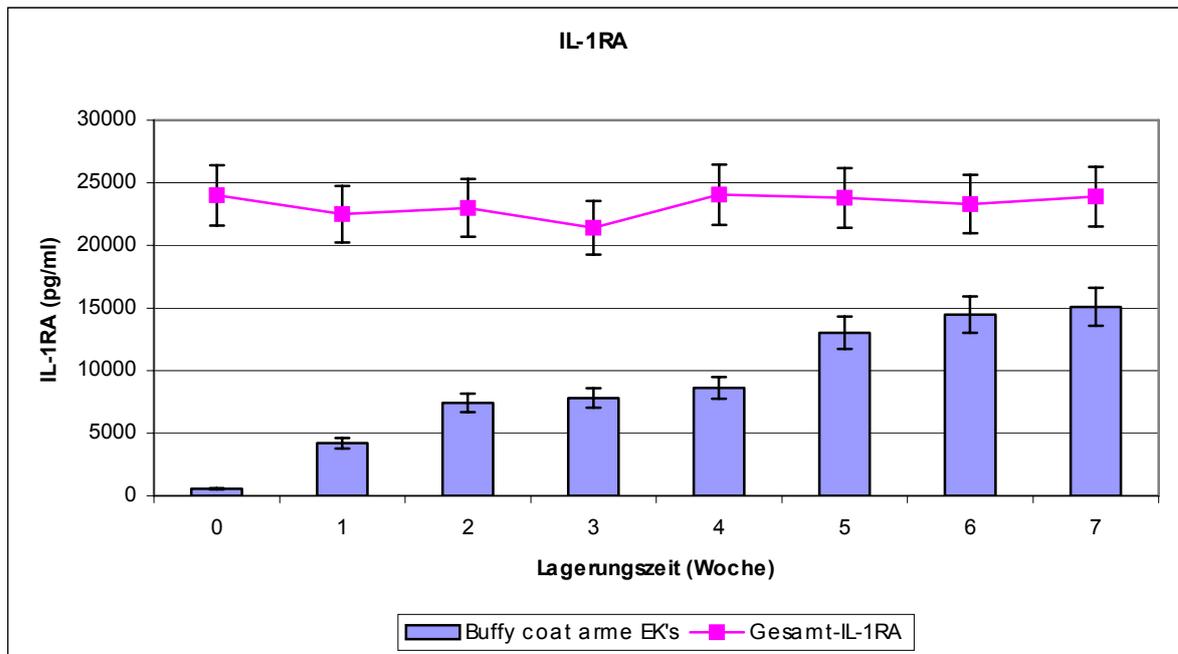
### 3.4.5 Interleukin-1 Rezeptor Antagonist (IL-1RA)

Die Zahl der Leukozyten betrug vor der Lagerung  $3.78 \pm 0.55 \times 10^9/l$  in den Buffy coat-armen EK's und  $0.24 \pm 0.048 \times 10^6/l$  in den in-line gefilterten EK's. Die Kinetik und der Mechanismus der Freisetzung von IL-1RA wurden aus Buffy coat-armen und gefilterten EK's untersucht.

Bei der Bestimmung von IL-1RA-Konzentrationen im Überstand konnten höhere Werte in den Buffy coat-armen EK's ( $859 \pm 218$  pg/ml) als in den gefilterten EK's ( $75 \pm 13$  pg/ml,  $p < 0,01$  Mann-Whitney U-Test) nachgewiesen werden. Weiterhin konnte, obwohl keine bedeutsame Änderung während der Lagerung bei den leukozytendepletierten gefilterten Konserven ( $82 \pm 18$  pg/ml am Tag 49) gefunden wurde, ein dramatischer Anstieg der IL-1RA Werte in den Buffy coat-armen EK's ( $16327 \pm 2686$  pg/ml am Tag 49) gezeigt werden (Abbildung 11).

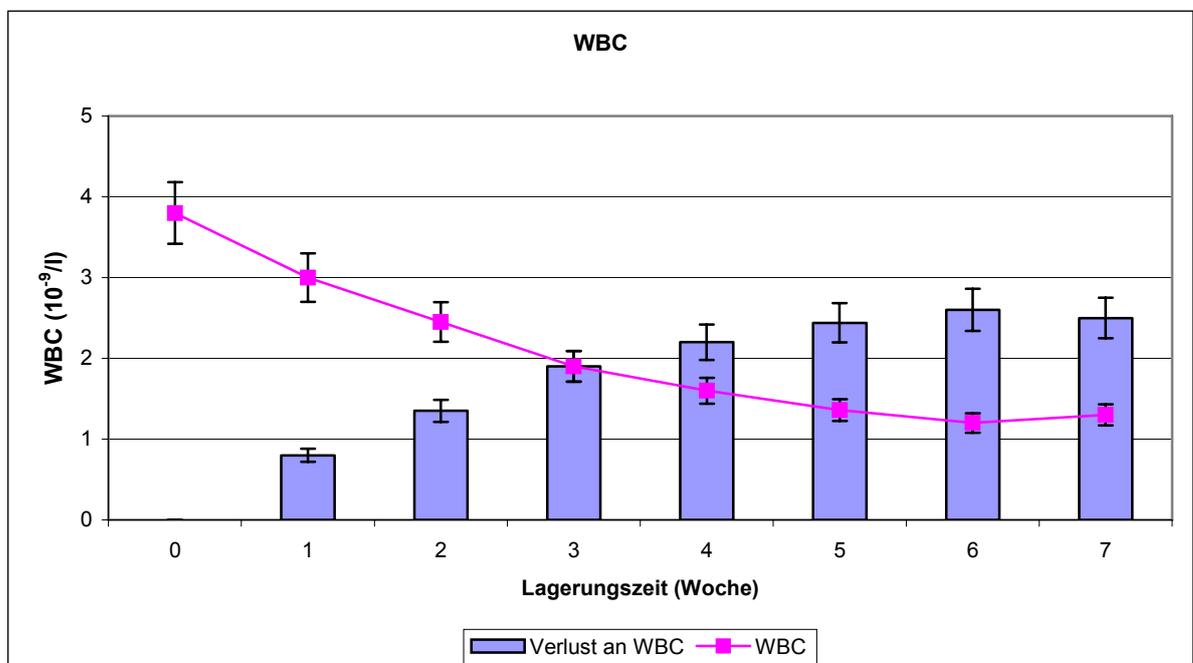
Um herauszufinden, ob neu gebildeter IL-1RA oder bereits präformierter, zellassoziierter IL-1RA freigesetzt wird, wurde eine Zell-Lyse der EK's durchgeführt. Nach der Lyse der Zellen wurde nur ein kleiner Anstieg der IL-1RA-Werte in den gefilterten EK's gefunden ( $445 \pm 175$  pg/ml vs.  $75 \pm 13$  pg/ml in den pre-storage Überständen,  $p < 0,05$  Wilcoxon-Test). Im Gegensatz dazu kam es zu einem hohen Anstieg der IL-1RA-Werte nach Zell-Lyse in den Buffy coat-armen EK's ( $23423 \pm 2953$  pg/ml vs.  $859 \pm 218$  pg/ml;  $p < 0,05$ , Wilcoxon-Test). Interessanterweise konnten während des gesamten Beobachtungszeitraumes keine wesentlichen Veränderungen der Gesamtmenge an IL-1RA (nach Zell-Lyse), weder bei den gefilterten EK's (Spannbreite 223-1062 pg/ml, Median 472 pg/ml), noch bei den Buffy coat-armen EK's (Spannbreite 21971-23937 pg/ml, Median 22801 pg/ml) nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse deuten an, dass der von der Lagerungszeit abhängige Anstieg der IL-1RA-Konzentration in den Überständen der Buffy coat-armen EK's durch die Freisetzung von präformierten zellassozierten IL-1RA und nicht aus einer *de novo* Synthese stammt (Abbildung 12). Um so mehr scheint der Anstieg von IL-1RA besonders in den nicht gefilterten Konserven durch die kontaminierenden Leukozyten hervorgerufen zu sein. Eine von der Lagerungszeit abhängige Abnahme der weißen Blutzellen konnte in den nicht gefilterten Konserven beobachtet werden. Es konnte über die gesamte Lagerzeit (1-7 Wochen) eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der weißen Blutzellen und der Zunahme des IL-1RA in den Überständen der nicht gefilterten Konserven nachgewiesen werden (Abbildung 13).

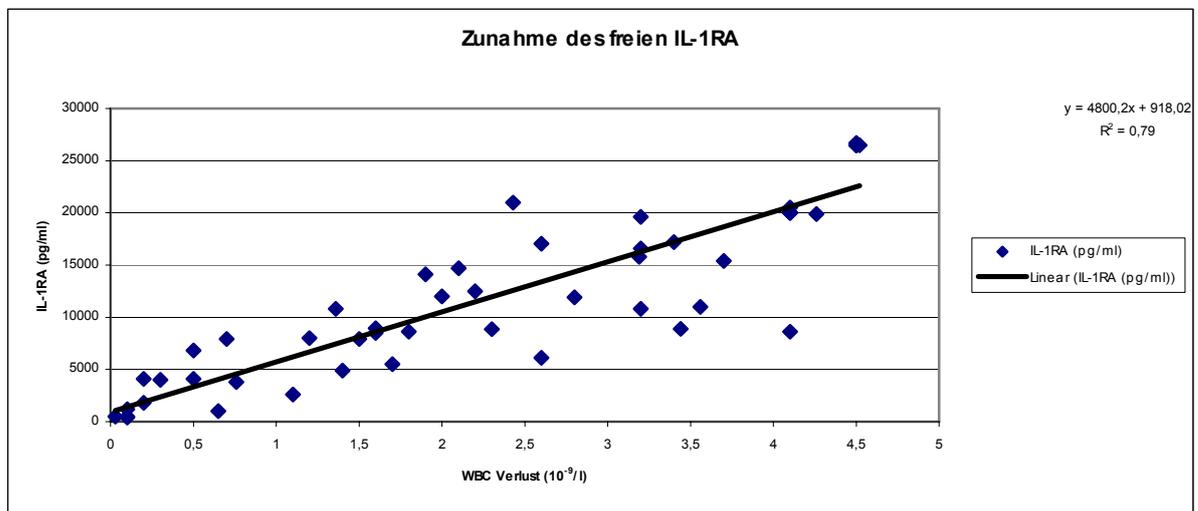


**Abbildung 11:** Darstellung des Verlaufes der IL-1RA-Konzentration in Buffy coat-armen EK's in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer.

Der Anstieg der IL-1RA-Konzentration mit der Lagerungsdauer ist beim wöchentlichen Vergleich bis zur 6. Lagerungswoche bedeutsam. Die Gesamtkonzentration von IL-1RA, bestimmt nach Zell-Lyse, blieb über den gesamten Verlauf unverändert.



**Abbildung 12:** Darstellung der Zahl der Leukozyten (WBC) in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer, sowie des Verlustes an WBC im Vergleich zu den Vorlagerungswerten. Die wöchentlichen Verluste an Leukozyten waren bis zur 6. Lagerungswoche signifikant ( $p < 0,05$ , Wilcoxon Test)



**Abbildung 13 :** Die Zunahme des freien IL-1RA korreliert mit dem Verlust an Leukozyten in den Buffy coat-armen EK's. Während der 7-wöchigen Lagerungszeit wurde die Zahl der Leukozyten und die IL-1RA-Konzentration im Überstand wöchentlich in 6 EK's bestimmt. Dargestellt sind die absoluten Zuwächse an IL-1RA und der absolute Verlust an Leukozyten. Die Werte wurden unabhängig von dem Messzeitpunkt dargestellt.

Wenn man die Zellzahl der weißen Blutzellen (WBC) aus den nicht gefilterten Konserven vor der Lagerung mit dem gesamten IL-1RA-Gehalt (korrigiert durch  $1/(1-\text{Hämatokrit})$ ) nach der Zell-Lyse in Verbindung bringt, ergibt sich eine starke positive Korrelation ( $r=0,82$ ,  $p<0,05$ ,  $N=6$ ). In der linearen Regressionsanalyse entsprechen  $1 \times 10^6$  WBC/ml in einem frischen nicht gefilterten EK 2550 pg/ml IL-1RA. Diese Daten sprechen dafür, dass die Zahl der weißen Blutzellen in den Buffy coat-armen EK vor der Lagerung direkt verantwortlich ist für die maximal freisetzbare Menge an IL-1RA während der Lagerungszeit. Passend dazu zeigten sich niedrige Werte von IL-1RA vor der Lagerung ( $382 \pm 105$  pg/ml) und auch nach 7 Wochen ( $82 \pm 18$  pg/ml) in den Überständen von gefilterten EK's, die nur noch eine sehr geringe Zahl von WBC ( $0,24 \pm 0,048 \times 10^6/l$ ) enthielten. Damit konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass die in-line Filtration die Freisetzung von IL-1RA deutlich reduziert und von Vorteil ist.

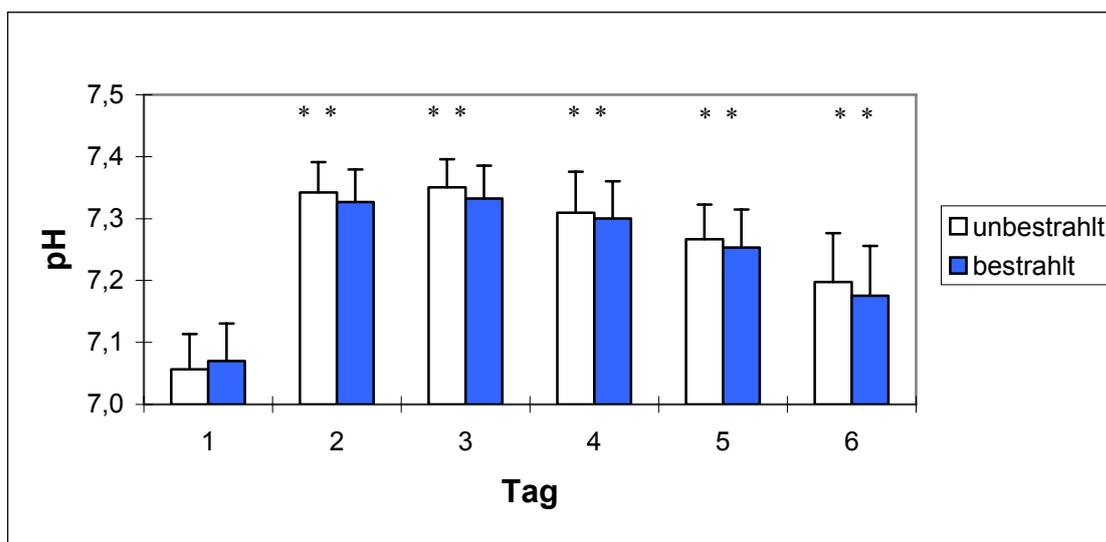
### 3.5 Bestrahlungsuntersuchungen an Thrombozytenkonzentraten

Bei den Bestrahlungsuntersuchungen wurden 7 Thrombozytenkonzentrate untersucht. Die Konzentrate wurden ausschließlich für die Qualitätsuntersuchungen randomisiert hergestellt und kamen nicht zur Anwendung am Patienten. Der zeitliche Verlauf der Mittelwerte des jeweils untersuchten Parameters sowie die entsprechende Standardabweichung sind hier dargestellt. Der Herstellungstag wurde im Text als solcher bezeichnet, in den Abbildungen als Tag 1. Der darauf folgende Tag wurde als zweiter Lagerungstag oder als Tag 2 bezeichnet und der sechste Tag ist der letzte Lagerungstag. Für die statistischen Auswertungen wurde der Wilcoxon-Test benutzt, die Irrtumswahrscheinlichkeit wird mit  $p < 0,05$  vorgegeben (siehe Statistik, Kapitel 2.8).

### 3.5.1 pH-Wert

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der pH-Wert Messung sind in Abbildung 14 dargestellt. Der am Herstellungstag gemessene pH-Wert der Thrombozytenkonzentrate war gegenüber den folgenden Werten im Mittel um 0,3 Einheiten niedriger. Er betrug in den unbestrahlten Anteilen  $7,06 \pm 0,06$  und in den bestrahlten Anteilen  $7,07 \pm 0,06$ . Im Vergleich zu allen folgenden Tagen sind diese Werte erniedrigt. Vom zweiten bis zum vierten Tag blieb der pH-Wert sowohl in den unbestrahlten als auch in den bestrahlten Anteilen ohne nennenswerte Änderung, die pH-Werte liegen für beide Anteile der Konzentrate im Mittel um 7,3. Am fünften und sechsten Tag der Lagerung fiel der pH-Wert in beiden Anteilen der Konzentrate auf Werte im Mittel um 7,2 ab, diese Änderung war gegenüber dem vierten Tag bemerkenswert. Der pH-Wert des sechsten Tages war gegenüber dem fünften Tag ebenfalls in beiden Anteilen erniedrigt.

Signifikante Unterschiede zwischen den pH-Werten der bestrahlten und unbestrahlten Anteile der Konzentrate konnten nicht nachgewiesen werden.



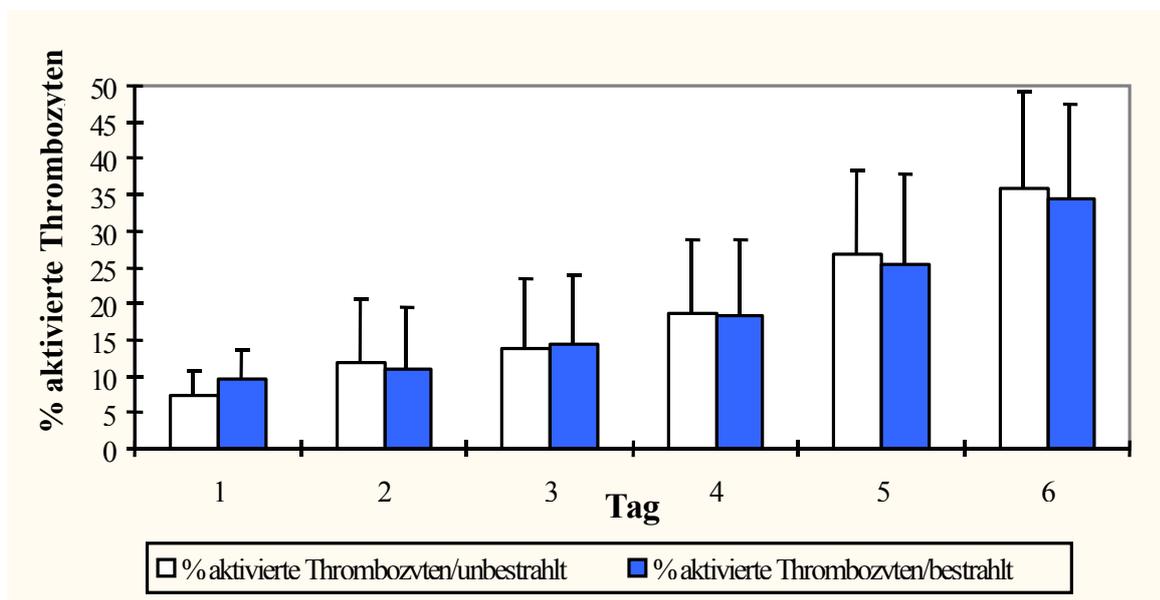
**Abbildung 14:** Mittelwerte und Standardabweichungen der pH-Werte unbestrahlter und bestrahlter Thrombozytenkonzentrate in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer. Die pH-Werte der unbestrahlten und bestrahlten Konzentrate zeigten an gleichen Tagen keine signifikanten Unterschiede. Die pH-Werte der Konzentrate waren am Herstellungstag signifikant niedriger im Vergleich zu allen folgenden Tagen (\*\*:  $p < 0,001$ ).

	1. Tag		2. Tag		3. Tag		4. Tag		5. Tag		6. Tag	
	unb.	bestr.										
<b>MW</b>	7,06	7,07	7,34	7,33	7,35	7,33	7,31	7,30	7,27	7,25	7,20	7,18
<b>SD</b>	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,07	0,06	0,06	0,06	0,08	0,08

**Tabelle 6:** pH-Wert: Mittelwerte und Standardabweichungen unbestrahlter und bestrahlter Thrombozytenkonzentrate ( $n=7$ ) in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer.

### 3.5.2 Durchflusszytometrie

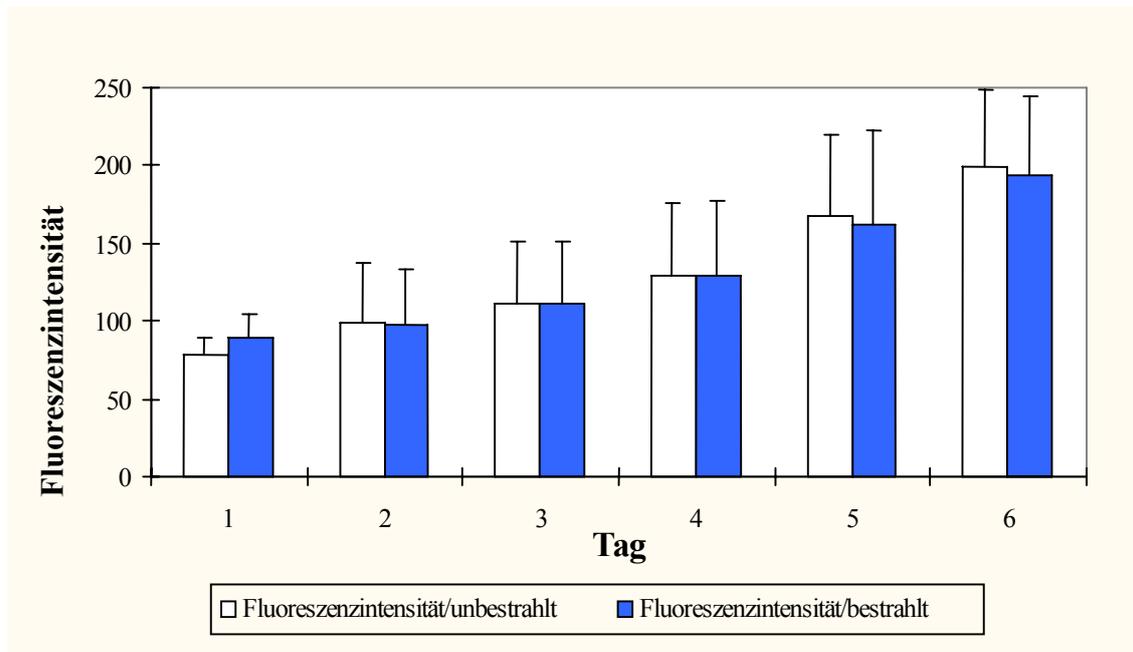
Die Mittelwerte und Standardabweichungen der flowzytometrischen Untersuchungen sind in den Abbildungen 15 und 16 sowie in den Tabellen 7 und 8 dargestellt. Die GMP-140-Expression wird durch zwei Parameter erfasst. In Abbildung 15 und Tabelle 7 sind die prozentualen Anteile aktivierter Thrombozyten angegeben, während in Abbildung 16 und Tabelle 8 die Absolutwerte der Fluoreszenzintensität wiedergegeben werden. Der prozentuale Anteil aktivierter Thrombozyten stieg im Verlauf der Lagerung von  $7,42 \pm 3,38$  % auf  $35,78 \pm 13,25$  % in den unbestrahlten Konzentraten und von  $9,57 \pm 4,08$  % auf  $34,4 \pm 12,9$  % in den bestrahlten Konzentraten der Thrombozytenkonzentrate kontinuierlich an. Ab dem fünften Tag war der Anstieg sichtbar für beide Konzentrate. Am Herstellungstag war der prozentuale Anteil aktivierter Thrombozyten in den bestrahlten Konzentraten höher als in den unbestrahlten Anteilen. Auch die Fluoreszenzintensität erhöhte sich kontinuierlich im Verlauf der Lagerung, von  $78,52 \pm 11,1$  auf  $199,7 \pm 49,35$  in den unbestrahlten Produkten und von  $89,66 \pm 14,94$  auf  $193,3 \pm 51,4$  in den bestrahlten Produkten. Diese Zunahme war bereits ab dem vierten Tag in beiden Anteilen der Konzentrate deutlich. Auch hierbei war am Herstellungstag die Fluoreszenzintensität in den bestrahlten Anteilen höher als in den unbestrahlten Anteilen ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 15:** Das Verhalten der GMP-140-Expression während der Lagerung von unbestrahlten und bestrahlten Thrombozytenkonzentraten: Mittelwerte und Standardabweichungen des prozentualen Anteils aktivierter Thrombozyten. Die Zahl aktivierter Thrombozyten erhöht sich von Tag zu Tag in beiden Anteilen der Konzentrate und wird ab dem fünften Tag sichtbar höher. Am Herstellungstag ist der prozentuale Anteil aktivierter Thrombozyten in den bestrahlten Anteilen der Konzentrate höher als in den unbestrahlten Anteilen.

	1. Tag		2. Tag		3. Tag		4. Tag		5. Tag		6. Tag	
	unb.	bestr.										
<b>MW</b>	7,42	9,57	11,82	11,06	13,93	14,47	18,69	18,46	26,89	25,42	35,78	34,4
<b>SD</b>	3,38	4,08	8,84	8,48	9,55	9,51	10,17	10,41	11,65	12,50	13,25	12,9

**Tabelle 7:** Mittelwerte und Standardabweichungen des prozentualen Anteils aktivierter Thrombozyten unbestrahlter und bestrahlter Thrombozytenkonzentrate (n=7) in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer.



**Abbildung 16:** Das Verhalten der GMP-140-Expression während der Lagerung von unbestrahlten und bestrahlten Thrombozytenkonzentraten: Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzintensität. Kontinuierliche Zunahme mit wesentlichem Unterschied ab dem vierten Tag gegenüber dem Herstellungstag in beiden Anteilen der Konzentrate. Am Herstellungstag war die Fluoreszenzintensität in den bestrahlten Anteilen höher als in den unbestrahlten Anteilen.

	1. Tag		2. Tag		3. Tag		4. Tag		5. Tag		6. Tag	
	unb.	bestr.										
<b>MW</b>	78,52	89,66	98,65	96,94	110,8	111,4	128,7	128,7	167,9	162,7	199,7	193,3
<b>SD</b>	11,1	14,94	38,09	36,47	40,34	39,49	46,44	47,99	49,4	59,18	49,35	51,4

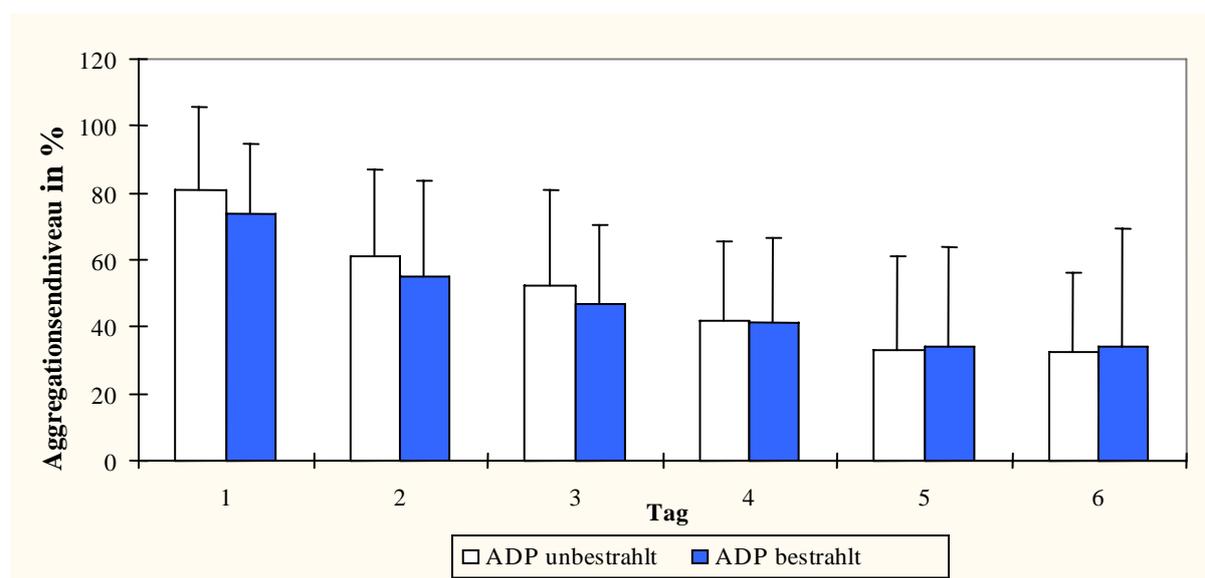
**Tabelle 8:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzintensität unbestrahlter und bestrahlter Thrombozytenkonzentrate (n=7) in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer.

### 3.5.3 Induzierte Thrombozytenaggregation

Die Thrombozytenaggregation wurde mittels ADP in zwei verschiedenen Konzentrationen ( $2 \times 10^{-4}$  M und  $0,2 \times 10^{-4}$  M), Ristocetin (10 mg/ml) und Collagen (1,9 mg/ml) induziert. Aus den Aggregationskurven wurden sowohl das absolute Aggregationsendniveau als auch der Abfall der Kurve in den ersten Sekunden bestimmt, letzteres wurde als Maß für die Aggregationsgeschwindigkeit verwendet. Die Thrombozytenaggregation wurde als prozentuale Veränderung der optischen Dichte von plättchenreichem Plasma nach der Zugabe von Stimuli definiert.

### 3.5.4 ADP und ADP<sub>low</sub>

Das Endniveau der durch ADP ausgelösten Aggregation nahm im Verlauf der Lagerung kontinuierlich ab, von im Mittel 81 % auf 32,3 % in den unbestrahlten Anteilen und von 73,7 % auf 34,4 % in den bestrahlten Anteilen der Konzentrate. Bei der durch ADP ausgelösten Aggregation waren die Werte in den unbestrahlten Anteilen in den folgenden Tagen gegenüber dem Herstellungstag sichtbar erniedrigt. In den bestrahlten Anteilen war bezogen auf den Herstellungstag die Aggregation nur vom dritten Tag bis zum fünften Tag erniedrigt. Statistisch relevante Unterschiede zwischen den unbestrahlten und bestrahlten Thrombozytenkonzentraten waren nicht nachzuweisen (Abbildung 17, Tabelle 9).



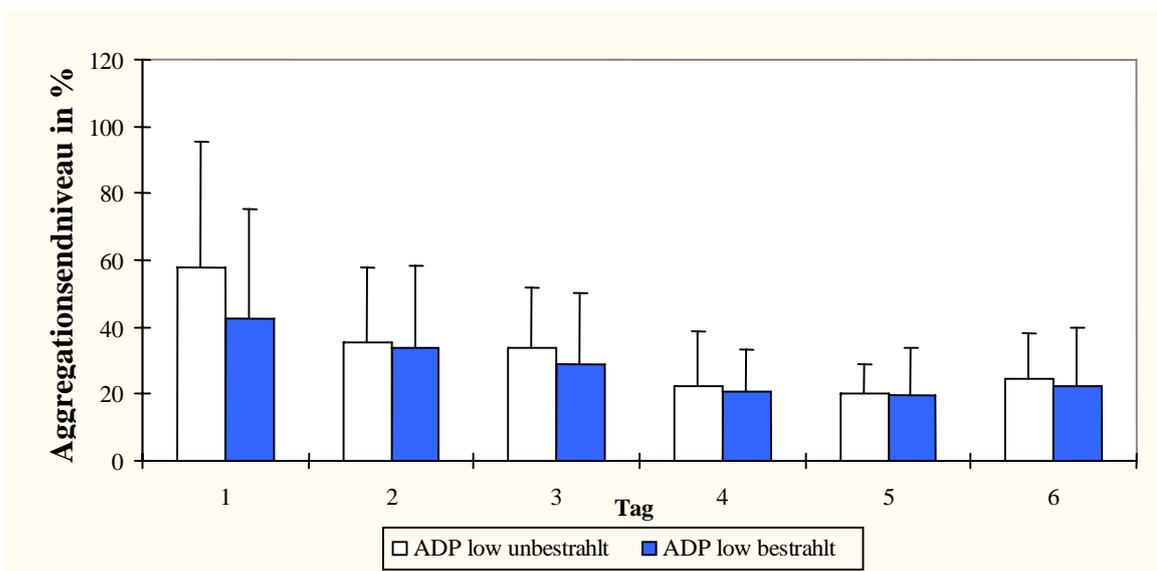
**Abbildung 17:** Die Mittelwerte und Standardabweichungen des Endniveaus der mit ADP induzierten Thrombozytenaggregation unbestrahlter und bestrahlter Thrombozytenkonzentrate in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer. Deutliche Abnahme des Aggregationsendniveaus, ab dem zweiten Tag in den unbestrahlten Anteilen und ab dem dritten Tag in den bestrahlten Anteilen der Konzentrate gegenüber dem Herstellungstag. Keine wesentlichen Unterschiede zwischen den unbestrahlten und bestrahlten Thrombozytenkonzentraten an den einzelnen Tagen.

	1. Tag		2. Tag		3. Tag		4. Tag		5. Tag		6. Tag	
	unb.	bestr.										
<b>MW</b>	81	73,67	61,07	54,93	52,29	46,71	41,71	41,29	33,29	33,86	32,29	34,4
<b>SD</b>	24,83	20,76	26,07	28,9	28,71	23,63	23,9	25,17	27,64	29,76	23,87	35,1

**Tabelle 9:** Mittelwerte und Standardabweichungen des Endniveaus der mit ADP induzierten Thrombozytenaggregation unbestrahlter und bestrahlter Thrombozytenkonzentrate (n=7) im Verlauf der Lagerung.

Bei der durch ADP<sub>low</sub> ausgelösten Aggregation war während der Lagerung ebenfalls eine Abnahme des Aggregationsendniveaus von 57,9 % auf 24,4 % in den unbestrahlten Anteilen und von 42,4 % auf 22,2 % in den bestrahlten Anteilen der Konzentrate zu erkennen. Allerdings war in den unbestrahlten Anteilen diese Abnahme nur für den vierten und fünften Tag signifikant, bezogen auf den Herstellungstag. In den bestrahlten Anteilen war die Abnahme nicht signifikant (Abbildung 18, Tabelle 10,).

Darüber hinaus war am Tag der Herstellung das Aggregationsendniveau in den bestrahlten Anteilen der Konzentrate erniedrigt. An den folgenden Tagen ließ sich kein nennenswerter Unterschied im Aggregationsmuster von unbestrahlten und bestrahlten Anteilen demonstrieren.

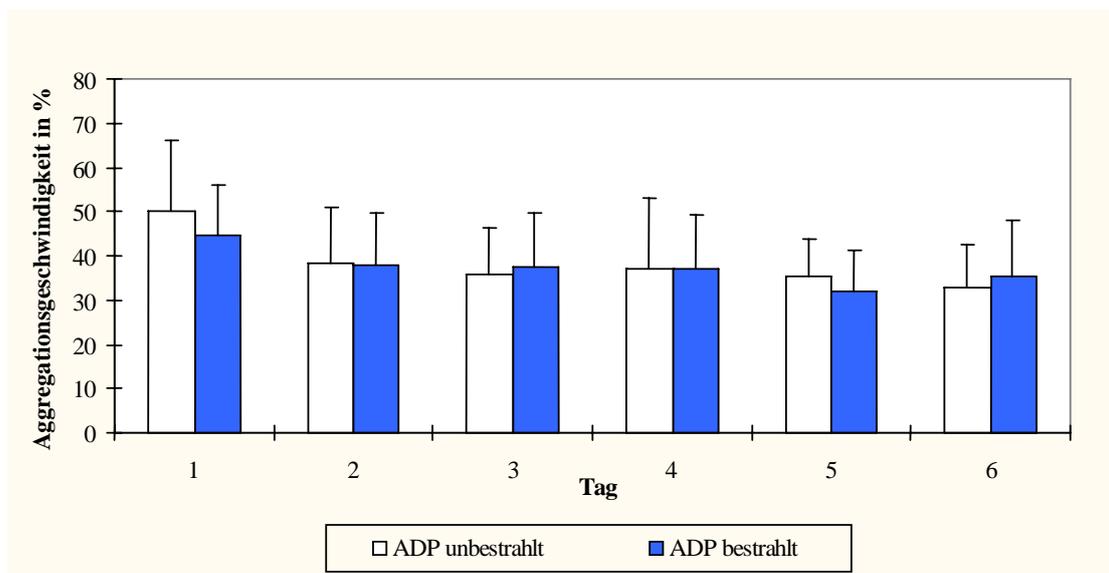


**Abbildung 18:** Mittelwerte und Standardabweichungen des Endniveaus der mit ADP<sub>low</sub> induzierten Thrombozytenaggregation unbestrahlter und bestrahlter Thrombozytenkonzentrate in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer. Die Abnahme des mit ADP<sub>low</sub> induzierten Endniveaus der Aggregation wurde in den unbestrahlten Anteilen der Konzentrate erst ab dem vierten Tag geringer gegenüber dem Herstellungstag, in den bestrahlten Anteilen war sie nicht von statistischer Relevanz. Signifikant geringeres Endniveau der Aggregation am Herstellungstag in den bestrahlten Anteilen verglichen mit den unbestrahlten Anteilen der Konzentrate.

	1. Tag		2. Tag		3. Tag		4. Tag		5. Tag		6. Tag	
	unb.	bestr.										
<b>MW</b>	57,86	42,43	35,5	33,64	33,57	29,14	22,57	20,57	20,07	19,57	24,43	22,2
<b>SD</b>	37,85	32,93	22,11	24,81	18,43	21,2	16,05	12,61	8,89	14,2	13,67	17,7

**Tabelle 10:** Mittelwerte und Standardabweichungen des Endniveaus der mit  $ADP_{low}$  induzierten Thrombozytenaggregation unbestrahlter und bestrahlter Thrombozytenkonzentrate ( $n=7$ ) im Verlauf der Lagerung.

Die Geschwindigkeit der durch ADP ausgelösten Aggregation zeigte ebenfalls eine Abnahme, von im Mittel 50,3 % auf 32,7 % für die unbestrahlten Anteile und von 44,6 % auf 35,1 % für die bestrahlten Anteile der Konzentrate. In den unbestrahlten Anteilen war diese Abnahme mit Ausnahme des fünften Tages deutlich bezogen auf den Herstellungstag. In den bestrahlten Anteilen war die Abnahme der Geschwindigkeit der Aggregation lediglich am vierten und fünften Tag nennenswert gegenüber dem Herstellungstag erniedrigt. Zwischen den unbestrahlten und bestrahlten Thrombozytenkonzentraten bestanden an den einzelnen Tagen keine Unterschiede (Abbildung 19, Tabelle 11).



**Abbildung 19:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Geschwindigkeit der mit ADP induzierten Thrombozytenaggregation unbestrahlter und bestrahlter Thrombozytenkonzentrate in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer.

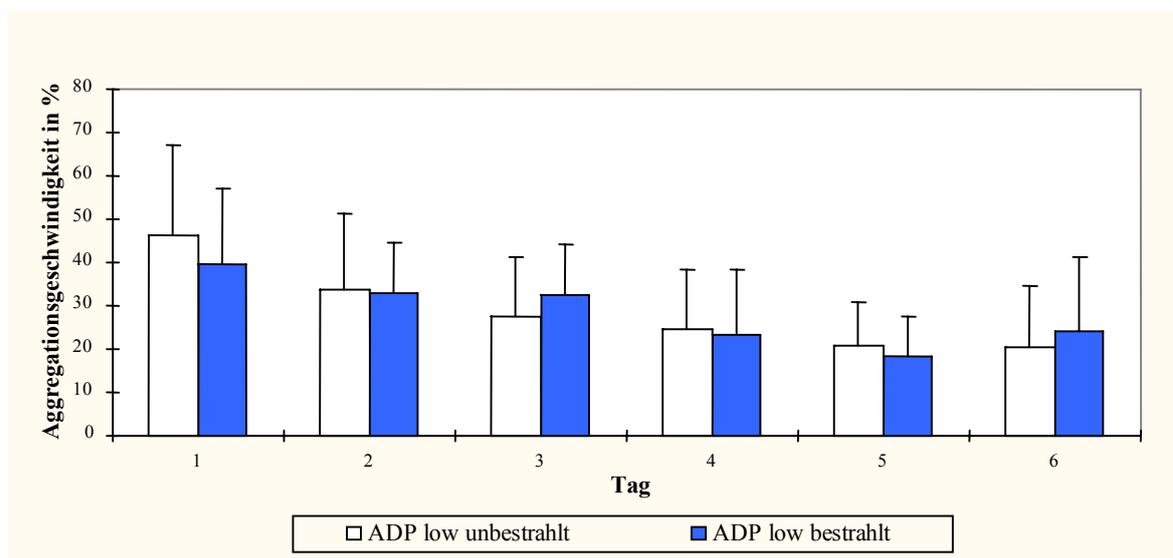
Es fand sich ein abnehmender Trend mit signifikantem Unterschied an allen Tagen. Die Ausnahme war der fünfte Tag in den unbestrahlten Anteilen und ab dem vierten Tag in den bestrahlten Anteilen der Konzentrate bezogen auf den Herstellungstag. Zwischen den unbestrahlten und den bestrahlten Anteilen der Konzentrate fanden sich an den einzelnen Tagen keine Unterschiede.

	1. Tag		2. Tag		3. Tag		4. Tag		5. Tag		6. Tag	
	Unb.	bestr.										
<b>MW</b>	50,29	44,57	38,14	38,07	35,64	37,43	37,14	37,00	35,57	32,00	32,67	35,1
<b>SD</b>	15,77	11,34	12,93	11,53	10,52	12,38	15,91	12,41	8,28	9,13	9,67	13,0

**Tabelle 11:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Geschwindigkeit der mit ADP induzierten Thrombozytenaggregation unbestrahlter und bestrahlter Thrombozytenkonzentrate (n=7) im Verlauf der Lagerung.

Die ADP<sub>low</sub> induzierte Thrombozytenaggregationsgeschwindigkeit war ebenfalls abnehmend, von im Mittel 46,3 % auf 20,6 % für die unbestrahlten Anteile und von 39,7 % auf 24 % für die bestrahlten Anteile der Konzentrate. In den unbestrahlten Anteilen war die Aggregationsgeschwindigkeit am dritten Tag erniedrigt gegenüber dem Herstellungstag. Die bestrahlten Anteile verhielten sich ähnlich wie bei der ADP (in hoher Konzentration) induzierten Thrombozytenaggregation. Die Aggregationsgeschwindigkeit war lediglich am vierten und am fünften Tag erniedrigt, gleichwohl war eine abnehmende Tendenz an allen Tagen erkennbar (Abbildung 20, Tabelle 12).

Zwischen den bestrahlten und den unbestrahlten Anteilen konnte auch für die durch ADP<sub>low</sub> induzierte Thrombozytenaggregation keine sicheren Unterschiede hinsichtlich der Aggregationsgeschwindigkeit an den einzelnen Tagen festgestellt werden.



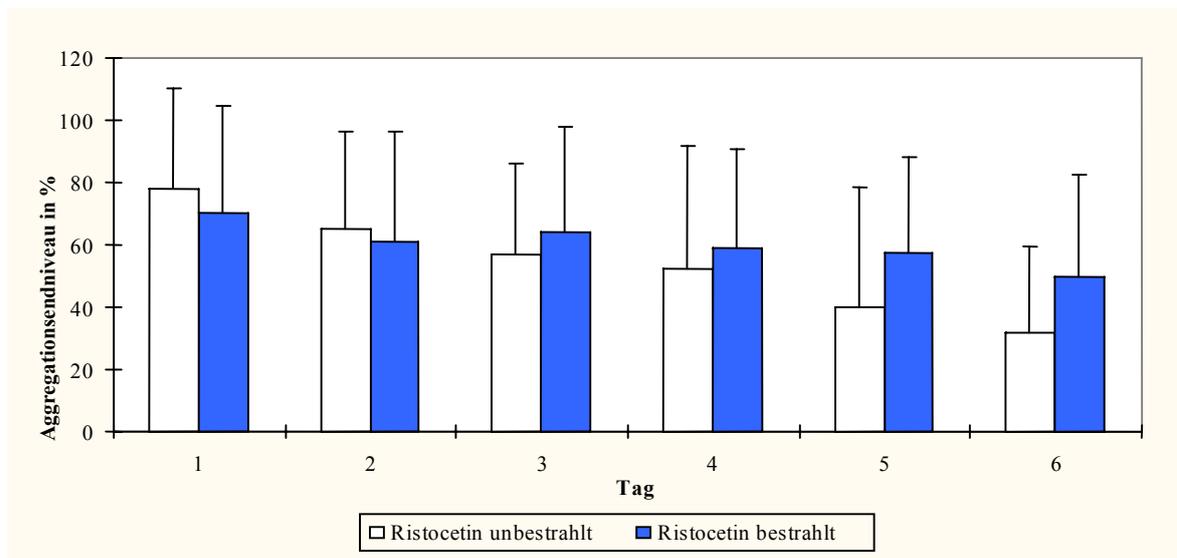
**Abbildung 20:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Geschwindigkeit der mit ADP<sub>low</sub> induzierten Thrombozytenaggregation unbestrahlter und bestrahlter Thrombozytenkonzentrate in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer. Abnehmender Trend mit signifikantem Unterschied ab dem dritten Tag in den unbestrahlten Anteilen und ab dem vierten Tag in den bestrahlten Anteilen der Konzentrate bezogen auf den Herstellungstag. Keine nennenswerten Unterschiede zwischen den unbestrahlten und den bestrahlten Anteilen der Konzentrate an den einzelnen Tagen.

	1. Tag		2. Tag		3. Tag		4. Tag		5. Tag		6. Tag	
	Unb.	bestr.										
<b>MW</b>	46,29	39,71	33,93	32,86	27,64	32,43	24,57	23,43	20,71	18,43	20,57	24
<b>SD</b>	20,69	17,58	17,36	11,8	13,68	11,76	13,78	15,09	10,01	8,867	14,11	17,3

**Tabelle 12:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Geschwindigkeit der mit  $ADP_{low}$  induzierten Thrombozytenaggregation unbestrahlter und bestrahlter Thrombozytenkonzentrate ( $n=7$ ) im Verlauf der Lagerung.

### 3.5.5 Ristocetin und Collagen

Auch für Ristocetin war eine stetige Abnahme des Aggregationsendniveaus im Verlauf der Lagerung in beiden Anteilen der Konzentrate nachweisbar. Das Aggregationsendniveau fiel von 77,8 % auf 31,6 % in den unbestrahlten Thrombozytenkonzentraten und von 70,5 % auf 49,6 % in den bestrahlten Thrombozytenkonzentraten. In den unbestrahlten Anteilen war diese Abnahme bezogen auf den Herstellungstag ab dem dritten Tag deutlich. In den bestrahlten Anteilen war die abnehmende Tendenz nicht sicher. Sowohl am Herstellungstag als auch an den darauf folgenden Tagen wurden keine bedeutsamen Unterschiede im Endniveau der Thrombozytenaggregation der unbestrahlten und der bestrahlten Konzentrate gefunden (Abbildung 21, Tabelle 13).

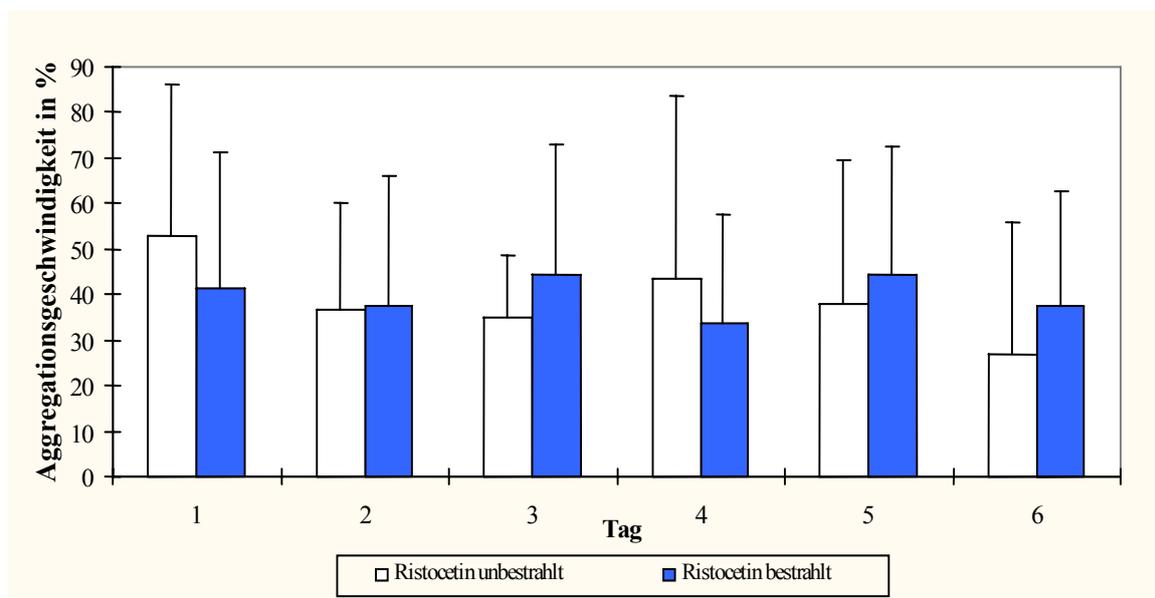


**Abbildung 21:** Der Verlauf der Mittelwerte und Standardabweichungen des Endniveaus der mit Ristocetin induzierten Thrombozytenaggregation unbestrahlter und bestrahlter Thrombozytenkonzentrate. Stetig abnehmendes Aggregationsendniveau mit Erniedrigung ab dem dritten Tag gegenüber dem Herstellungstag in den unbestrahlten Anteilen der Konzentrate. Keine statistisch relevanten Unterschiede in den bestrahlten Anteilen der Konzentrate. Keine bedeutsamen Unterschiede zwischen den unbestrahlten und bestrahlten Thrombozytenkonzentraten an den einzelnen Tagen.

	1. Tag		2. Tag		3. Tag		4. Tag		5. Tag		6. Tag	
	Unb.	bestr.										
MW	77,83	70,5	65,11	61	56,86	64	52,36	59,07	40	57,57	31,6	49,6
SD	32,52	34,03	31,3	35,6	29,26	33,83	39,46	31,5	38,57	30,47	27,9	33,1

**Tabelle 13:** Mittelwerte und Standardabweichungen des Endniveaus der mit Ristocetin induzierten Thrombozytenaggregation unbestrahlter und bestrahlter Thrombozytenkonzentrate (n=7) im Verlauf der Lagerung.

Die Geschwindigkeit der durch Ristocetin induzierten Aggregation war in beiden Anteilen der Konzentrate variabel und schwankte zwischen 52,8 % und 26,8 % in den unbestrahlten Anteilen sowie zwischen 41,5 % und 37,6 % in den bestrahlten Anteilen der Konzentrate. Gegenüber dem Herstellungstag gab es in beiden Anteilen der Konzentrate keine Unterschiede. Zwischen den unbestrahlten und bestrahlten Anteilen der Konzentrate bestanden keine bedeutsamen Unterschiede an den einzelnen Tagen (Abbildung 22, Tabelle 14).

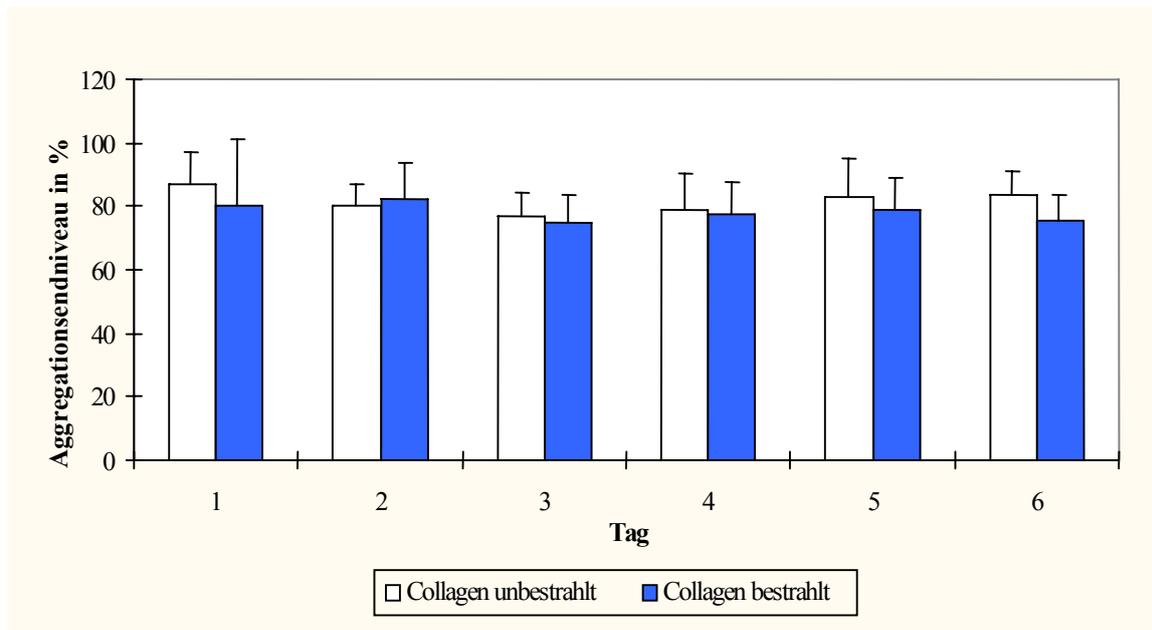


**Abbildung 22:** Der Verlauf der Mittelwerte und Standardabweichungen der Geschwindigkeit der mit Ristocetin induzierten Thrombozytenaggregation: Variabler Verlauf ohne typische Veränderungen gegenüber dem Herstellungstag in beiden Anteilen der Konzentrate. Keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den unbestrahlten und bestrahlten Thrombozytenkonzentraten an den einzelnen Tagen.

	1. Tag		2. Tag		3. Tag		4. Tag		5. Tag		6. Tag	
	Unb.	bestr.										
MW	52,86	41,57	36,79	37,7	35	44,2	43,57	33,57	38,08	44,36	26,8	37,6
SD	33,47	29,8	23,26	28,5	13,45	28,91	39,89	23,82	31,39	27,97	28,92	24,8

**Tabelle 14:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Geschwindigkeit der mit Ristocetin induzierten Thrombozytenaggregation unbestrahlter und bestrahlter Thrombozytenkonzentrate (n=7) im Verlauf der Lagerung.

Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Abnahme im Aggregationsverhalten blieb das durch Collagen induzierte Endniveau der Aggregation sowohl in den unbestrahlten als auch in den bestrahlten Anteilen der Konzentrate im gesamten Verlauf der Lagerung stabil. Das Aggregationsendniveau bewegte sich für beide Anteile der Konzentrate im Mittel um 80 %. Es waren für beide Anteile keine wesentlichen Unterschiede gegenüber dem Herstellungstag feststellbar. Es bestanden keine Unterschiede zwischen den unbestrahlten und bestrahlten Thrombozytenkonzentraten an den einzelnen Tagen (Abbildung 23, Tabelle 15).

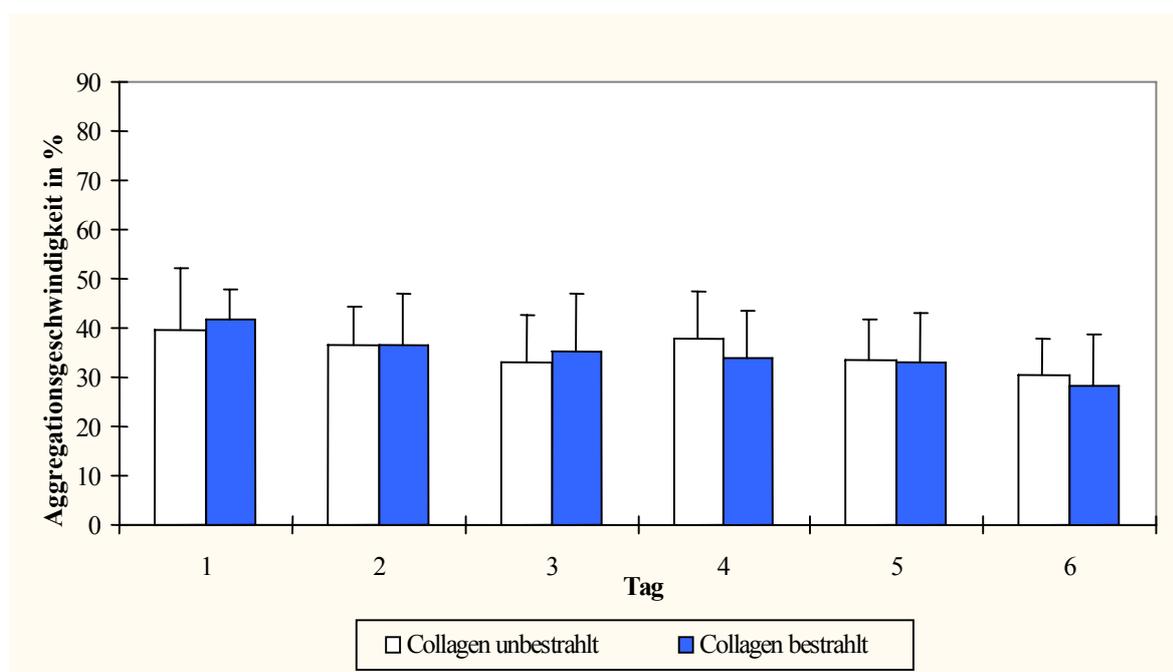


**Abbildung 23:** Der Verlauf der Mittelwerte und Standardabweichungen des Endniveaus der mit Collagen induzierten Thrombozytenaggregation unbestrahlter und bestrahlter Thrombozytenkonzentrate: Relativ konstanter Verlauf ohne wesentliche Veränderungen gegenüber dem Herstellungstag in beiden Anteilen der Konzentrate. Keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen unbestrahlten und bestrahlten Thrombozytenkonzentraten an den einzelnen Tagen.

	1. Tag		2. Tag		3. Tag		4. Tag		5. Tag		6. Tag	
	Unb.	bestr.										
<b>MW</b>	86,71	80,14	79,93	82	76,83	75,17	78,83	77,67	82,67	78,57	83,4	75,4
<b>SD</b>	10,6	21,0	7,0	11,9	7,7	8,7	11,3	10,1	12,2	10,4	7,6	8,0

**Tabelle 15:** Mittelwerte und Standardabweichungen des Endniveaus der mit Collagen induzierten Thrombozytenaggregation unbestrahlter und bestrahlter Thrombozytenkonzentrate (n=7) im Verlauf der Lagerung.

Die Geschwindigkeit der mit Collagen induzierten Aggregation wies ebenfalls keine sicheren Unterschiede sowohl gegenüber dem Herstellungstag als auch zwischen den beiden Anteilen der Konzentrate an den einzelnen Tagen auf. Die Werte lagen im Mittel um 35 % für beide Anteile der Konzentrate. Lediglich am sechsten Tag bezogen auf den Herstellungstag war in den bestrahlten Anteilen die Aggregationsgeschwindigkeit erniedrigt (Abbildung 24, Tabelle 16).



**Abbildung 24:** Verlauf der Mittelwerte und Standardabweichungen der Geschwindigkeit der mit Collagen induzierten Thrombozytenaggregation: Keine sicheren Veränderungen gegenüber dem Herstellungstag in beiden Anteilen der Konzentrate mit Ausnahme des sechsten Tages für die bestrahlten Anteile. Keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen unbestrahlten und bestrahlten Konzentraten an den einzelnen Tagen.

	1. Tag		2. Tag		3. Tag		4. Tag		5. Tag		6. Tag	
	Unb.	bestr.										
<b>MW</b>	39,43	41,83	36,5	36,5	32,93	35,14	37,71	34,07	33,29	32,86	30,5	28,1
<b>SD</b>	12,84	5,879	8,016	10,29	9,8	11,6	9,844	9,602	8,66	10,12	7,232	10,7

**Tabelle 16:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Geschwindigkeit der mit Collagen induzierten Thrombozytenaggregation unbestrahlter und bestrahlter Thrombozytenkonzentrate (n=7) im Verlauf der Lagerung.

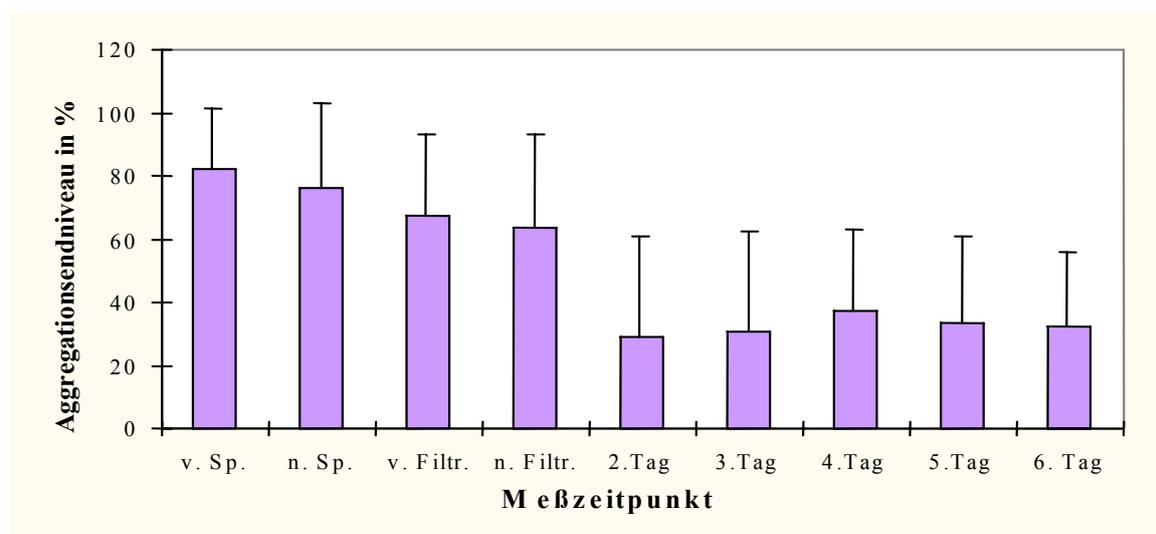
### 3.6 Lagerungsuntersuchungen an Thrombozytenkonzentraten ohne Bestrahlung

#### 3.6.1 Die induzierte Thrombozytenaggregation

Die Thrombozytenaggregation wurde mittels ADP in zwei verschiedenen Konzentrationen ( $2 \times 10^{-4}$  M und  $2 \times 10^{-5}$  M), Ristocetin (10 mg/ml) und Collagen (1,9 mg/ml) induziert. Aus den Aggregationskurven wurden sowohl das absolute Aggregationsendniveau als auch der Abfall der Kurve in den ersten Sekunden bestimmt, letzteres wurde als Maß für die Aggregationsgeschwindigkeit verwendet. Die Thrombozytenaggregation ist die prozentuale Veränderung der optischen Dichte von plättchenreichem Plasma nach der Zugabe von Stimuli. Im Gegensatz zu Kapitel 3.5 (Bestrahlungsuntersuchungen an Thrombozytenkonzentraten) wurden die Thrombozytenfunktionstestungen an den Spendern vor der Spende und an unbestrahlten Thrombozytenkonzentraten unmittelbar nach der Spende, vor und nach der Filtration (1.Tag der Lagerung) sowie am 2. Tag bis zum 6. Tag der Lagerung vorgenommen.

#### 3.6.2 ADP und $ADP_{low}$

Das Endniveau der mit ADP induzierten Thrombozytenaggregation betrug vor der Spende im Mittel 82 % und erniedrigte sich nach der Filtration der Thrombozytenkonzentrate auf 63 %. Ab dem zweiten Lagerungstag verringerte sich das Aggregationsniveau auf ca. 30 % und unterschied sich damit deutlich gegenüber allen Werten, sowohl vor, als auch nach Filtration der Thrombozytenkonzentrate. Die Unterschiede zwischen den Werten unmittelbar nach der Spende und vor, sowie nach Filtration sind nicht wesentlich (Abbildung 25, Tabelle 17).



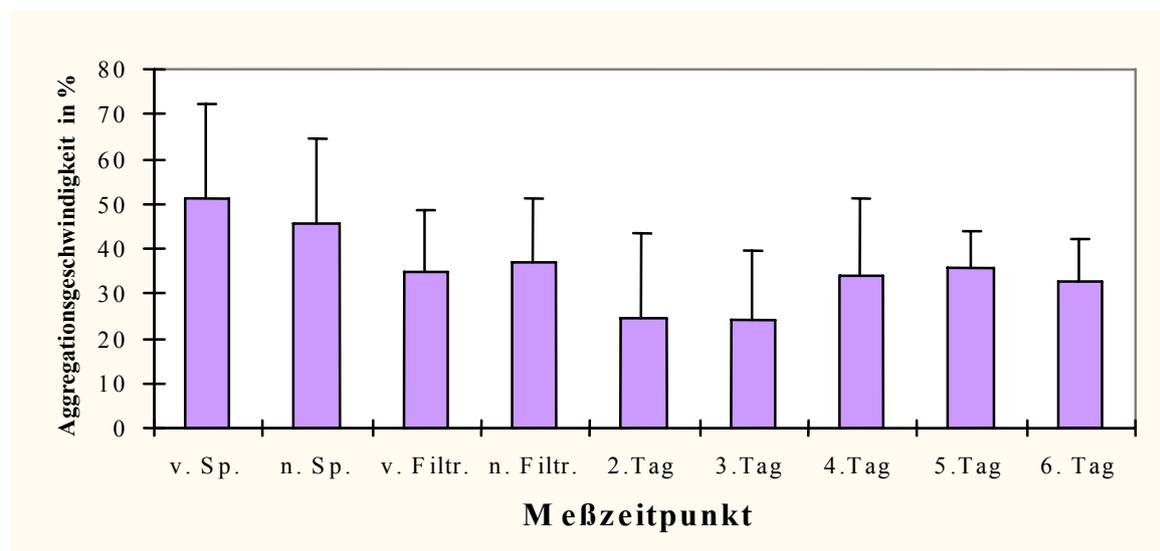
**Abbildung 25:** Der Verlauf der Mittelwerte und Standardabweichungen der induzierten Thrombozytenaggregation mit ADP unter Spende, Filtration und Lagerung

Das Endniveau der mit ADP induzierten Thrombozytenaggregation verringerte sich im Verlaufe der Untersuchung kontinuierlich. Bis auf die Werte nach der Spende und vor, sowie nach der Filtration, sind alle übrigen Werte deutlich erniedrigt gegenüber dem Ausgangswert vor der Spende.

	vor Sp.	n. Sp.	v. Filtr.	n. Filtr.	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
<b>MW</b>	82,44	75,93	67,62	63,42	28,82	30,92	37,13	33,29	32,29
<b>SD</b>	18,79	26,87	25,28	29,78	31,91	31,58	25,65	27,64	23,87
<b>n</b>	43	43	42	42	17	13	8	7	7

**Tabelle 17:** Die induzierte Thrombozytenaggregation mit ADP: Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) des Endniveaus der induzierten Thrombozytenaggregation, sowie die Anzahl n der untersuchten Thrombozytenkonzentrate.

Die Geschwindigkeit der mit ADP induzierten Aggregation zeigte ähnliche Unterschiede in Abhängigkeit vom Messzeitpunkt, wie das Aggregationsendniveau. Sie verringerte sich von im Mittel 51 % vor der Spende auf 37 % nach der Filtration. Im Gegensatz zum Aggregationsendniveau verringerte sich jedoch die Aggregationsgeschwindigkeit auch nach der Spende und vor der Filtration im Vergleich zu den Werten vor der Spende sichtbar. In Übereinstimmung mit dem Aggregationsendniveau waren die Aggregationsgeschwindigkeiten vom zweiten Lagerungstag an niedriger, als nach der Filtration der Thrombozytenkonzentrate (Abbildung 26, Tabelle 18).



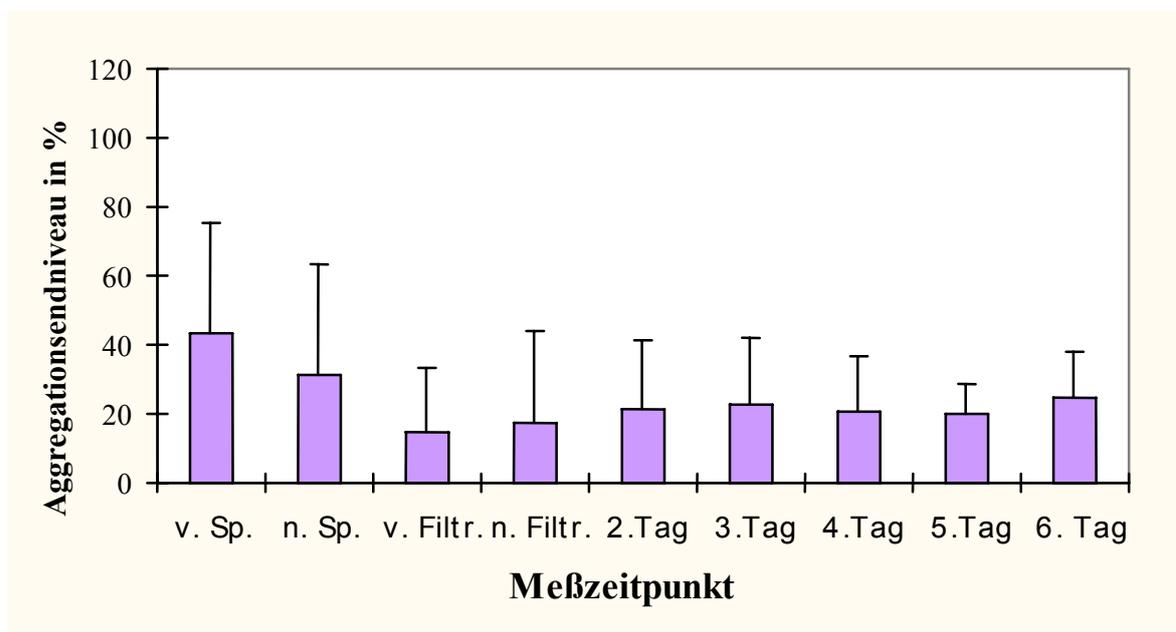
**Abbildung 26:** Der Verlauf der Mittelwerte und Standardabweichungen der Geschwindigkeit der induzierten Thrombozytenaggregation mit ADP unter Spende, Filtration und Lagerung.

Ähnlich dem Aggregationsendniveau zeigt auch die Geschwindigkeit der mit ADP induzierten Thrombozytenaggregation eine kontinuierlich abnehmende Tendenz. Ab dem zweiten Lagerungstag ist die Geschwindigkeit der Aggregation niedriger gewesen, als nach der Filtration, darüber hinaus sind die Werte der Aggregationsgeschwindigkeit nach der Spende, sowie vor der Filtration bedeutsam niedriger gewesen, als vor der Spende.

	vor Sp.	n. Sp.	v. Filtr.	n. Filtr.	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
<b>MW</b>	51,16	45,49	35,02	36,91	24,47	23,96	33,88	35,57	32,67
<b>SD</b>	20,95	19,00	13,55	14,15	18,89	15,48	17,39	8,28	9,67
<b>n</b>	43	43	42	42	17	13	8	7	7

**Tabelle 18:** Die induzierte Thrombozytenaggregation mit ADP unter Spende, Filtration und Lagerung: Mittelwerte und Standardabweichungen der Aggregationsgeschwindigkeit, sowie die Anzahl (n) der untersuchten Thrombozytenkonzentrate.

Die Aggregation mit ADP<sub>low</sub> zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die mit ADP induzierte Thrombozytenaggregation. Das Endniveau der mit ADP<sub>low</sub> induzierten Aggregation betrug vor der Spende im Mittel 43 % und erniedrigte sich bereits nach der Spende auf 31 %. Auch alle folgenden Werte sind bezogen auf die Werte vor der Spende sichtbar erniedrigt (Abbildung 27, Tabelle 19).



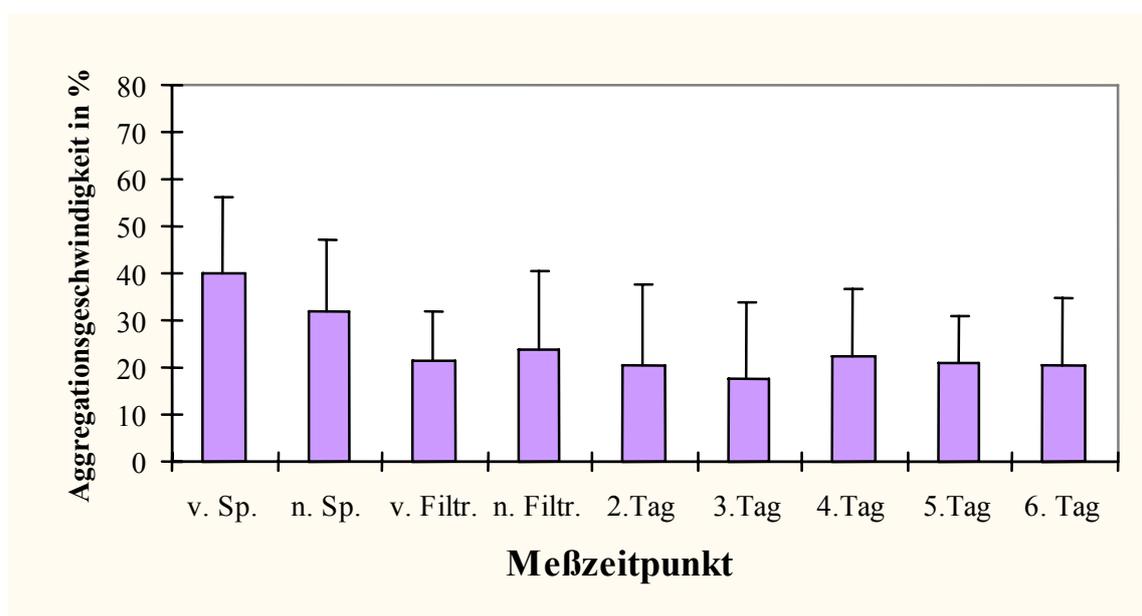
**Abbildung 27:** Der Verlauf der Mittelwerte und Standardabweichungen der induzierten Thrombozytenaggregation mit ADP<sub>low</sub> unter Spende, Filtration und Lagerung.

Es fand sich eine kontinuierliche Abnahme der prozentualen Thrombozytenaggregation. Wesentliche Unterschiede bestanden bereits unmittelbar nach der Spende und zu allen weiteren Zeitpunkten.

	vor Sp.	n. Sp.	v. Filtr.	n. Filtr.	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
<b>MW</b>	43,57	31,51	14,76	17,49	21,28	22,92	20,63	20,07	24,43
<b>SD</b>	31,65	31,49	18,33	26,34	20,16	19,36	15,85	8,89	13,67
<b>n</b>	37	37	35	35	16	12	8	7	7

**Tabelle 19:** Die induzierte Thrombozytenaggregation mit  $ADP_{low}$  unter Spende, Filtration und Lagerung: Mittelwerte und Standardabweichungen des Endniveaus der Thrombozytenaggregation, sowie die Anzahl (n) der untersuchten Thrombozytenkonzentrate.

Die Geschwindigkeit der mit  $ADP_{low}$  induzierten Thrombozytenaggregation zeigte ebenfalls eine abnehmende Tendenz. Sie verringerte sich von im Mittel 40 % vor der Spende auf 32 % nach der Spende. Alle folgenden Werte waren ebenfalls deutlich gegenüber den Werten vor der Spende und nach der Spende erniedrigt (Abbildung 28, Tabelle 20) .



**Abbildung 28:** Der Verlauf der Mittelwerte und Standardabweichungen der Geschwindigkeit der Thrombozytenaggregation mit  $ADP_{low}$  unter Spende, Filtration und Lagerung.

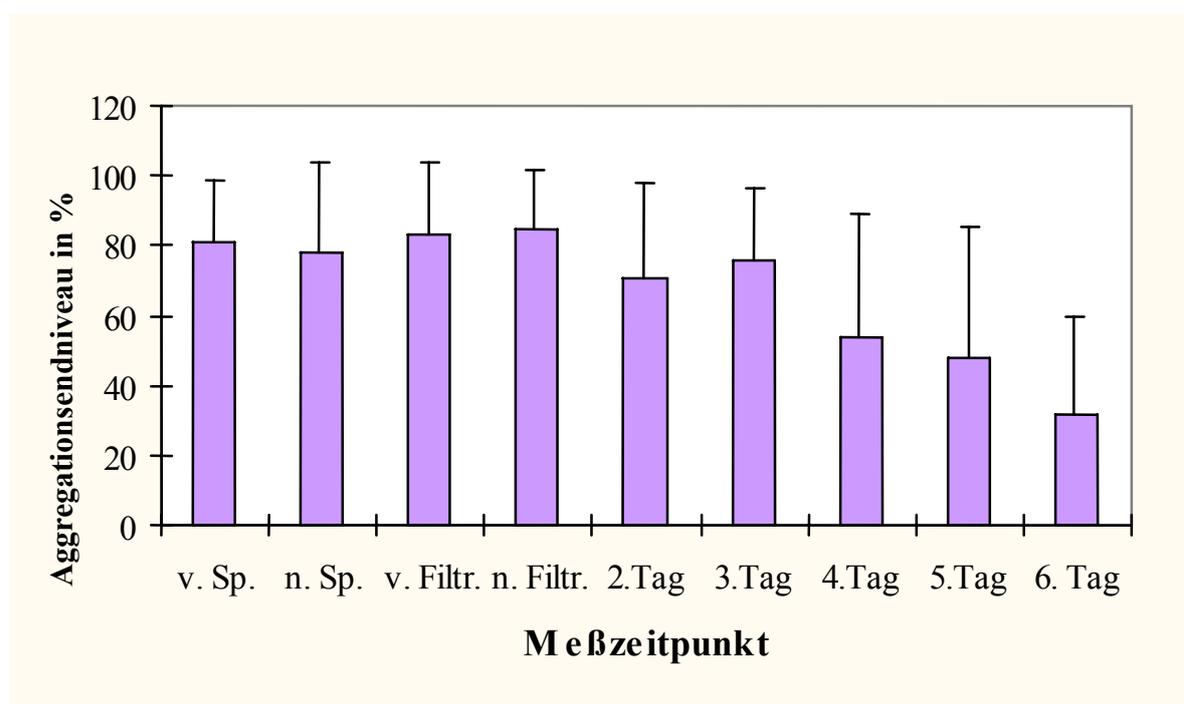
Auch hier fand sich eine kontinuierliche Abnahme der Geschwindigkeit der Aggregation. Gegenüber vor und nach der Spende waren alle übrigen Werte erniedrigt.

	vor Sp.	n. Sp.	v. Filtr.	n. Filtr.	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
<b>MW</b>	40,16	32,06	21,46	23,64	20,28	17,46	22,38	20,71	20,57
<b>SD</b>	15,80	15,02	10,56	16,63	17,33	16,14	14,19	10,01	14,11
<b>n</b>	37	37	35	35	16	12	8	7	7

**Tabelle 20:** Die induzierte Thrombozytenaggregation mit  $ADP_{low}$ : Mittelwerte und Standardabweichungen der Geschwindigkeit der Thrombozytenaggregation, sowie die Anzahl (n) der untersuchten Thrombozytenkonzentrate.

### 3.6.3 Ristocetin

Das Endniveau der mit Ristocetin induzierten Thrombozytenaggregation blieb bis zum dritten Tag im Mittel auf einem Wert um 80 %. Am vierten Tag verringerte sich die prozentuale Thrombozytenaggregation auf 54 %, was eine nennenswerte Abnahme gegenüber den Ergebnissen vor der Spende darstellt. Diese Abnahme des Endniveaus der Aggregation setzte sich an den letzten beiden Untersuchungstagen fort (Abbildung 29, Tabelle 21).



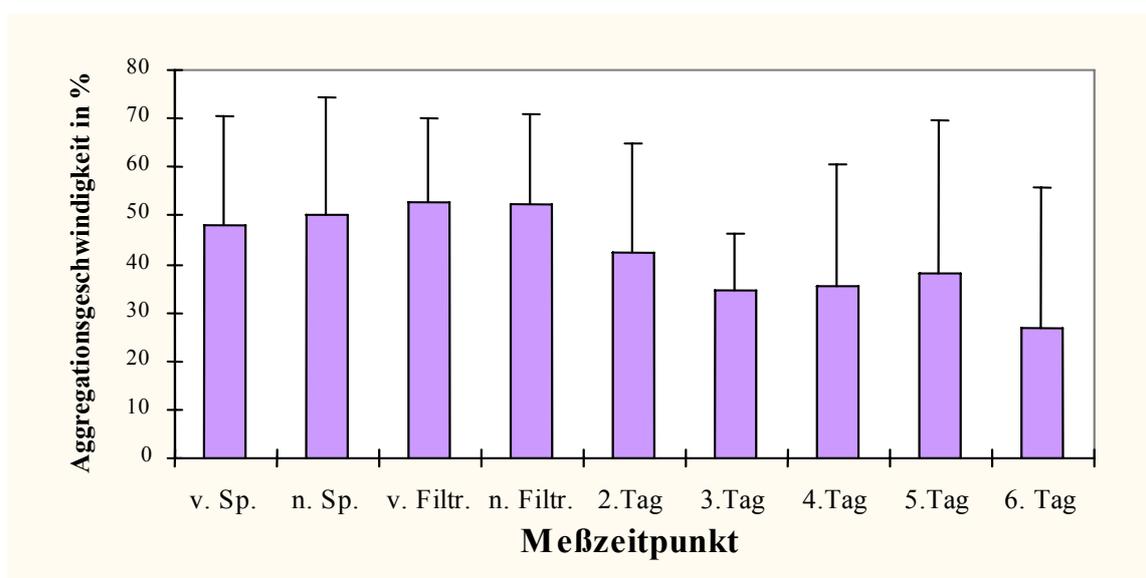
**Abbildung 29:** Der Verlauf der Mittelwerte und Standardabweichungen der mit Ristocetin induzierten Thrombozytenaggregation unter Spende, Filtration und Lagerung.

Das Endniveau der Aggregation blieb bis zum dritten Tag relativ konstant, und fiel anschließend deutlich ab.

	vor Sp.	n. Sp.	v. Filtr.	n. Filtr.	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
<b>MW</b>	80,63	78,05	83,20	84,64	70,41	75,92	54,06	40,0	31,60
<b>SD</b>	18,26	25,77	20,77	16,63	27,74	20,36	35,10	38,57	27,90
<b>n</b>	32	32	31	31	14	9	8	7	7

**Tabelle 21:** Die induzierte Thrombozytenaggregation mit Ristocetin: Mittelwerte und Standardabweichungen des Aggregationsendniveaus, sowie die Anzahl (n) der untersuchten Thrombozytenkonzentrate.

Die Geschwindigkeit der mit Ristocetin induzierten Thrombozytenaggregation wies im gesamten Verlauf der Untersuchungen gegenüber dem Ausgangswert von 48 % keine sicheren Unterschiede auf, ausgenommen hiervon ist der sechste Tag, an dem mit 26 % ein deutlich niedriger Wert festgestellt wurde (Abbildung 30, Tabelle 22).



**Abbildung 30:** Der Verlauf der Mittelwerte und Standardabweichungen der Geschwindigkeit der Thrombozytenaggregation mit Ristocetin unter Spende, Filtration und Lagerung.

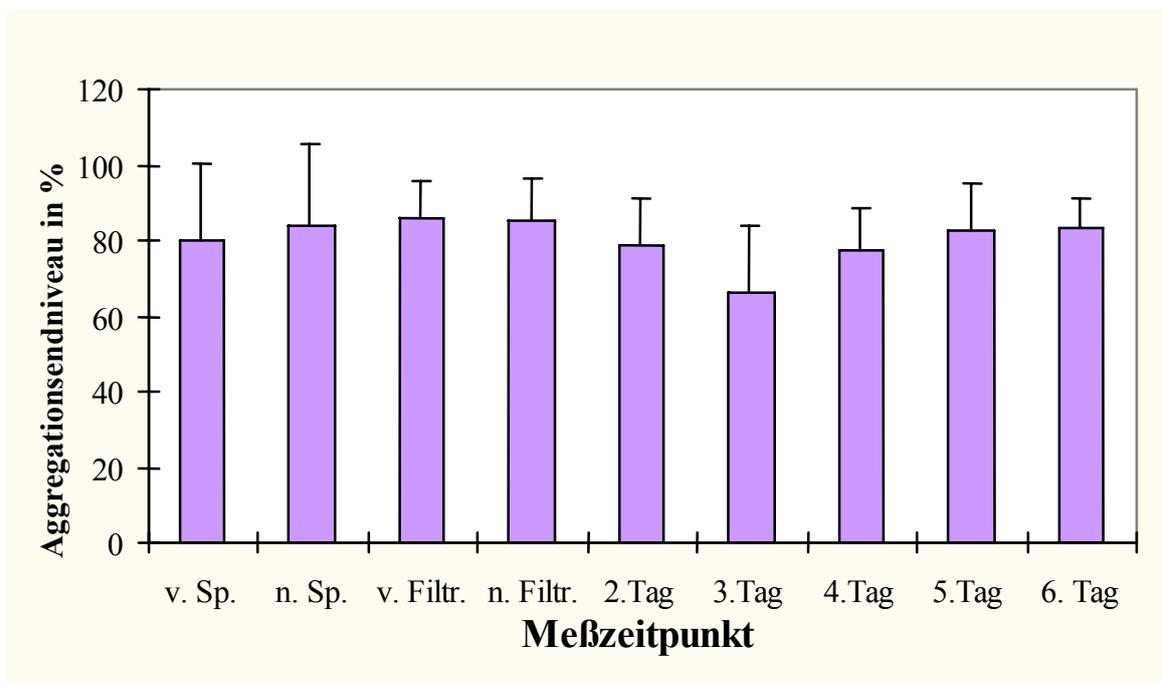
Es fand sich ein variabler Verlauf der Aggregationsgeschwindigkeit. Ein signifikanter Unterschied war nur am sechsten Tag erkennbar.

	vor Sp.	n. Sp.	v. Filtr.	n. Filtr.	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
<b>MW</b>	48,10	50,17	52,69	52,27	42,25	34,78	35,38	38,08	26,80
<b>SD</b>	22,50	24,17	17,57	18,62	22,45	11,66	25,12	31,39	28,92
<b>n</b>	32	32	31	31	14	9	8	7	7

**Tabelle 22:** Die mit Ristocetin induzierte Thrombozytenaggregation: Mittelwerte und Standardabweichungen der Geschwindigkeit der Aggregation, sowie die Anzahl (n) der untersuchten Thrombozytenkonzentrate.

### 3.6.4 Collagen

Das Endniveau der mit Collagen induzierten Thrombozytenaggregation blieb im Verlauf der gesamten Untersuchung im Mittel auf Werten um 80 % ohne bedeutsame Unterschiede (Abbildung 31, Tabelle 23).



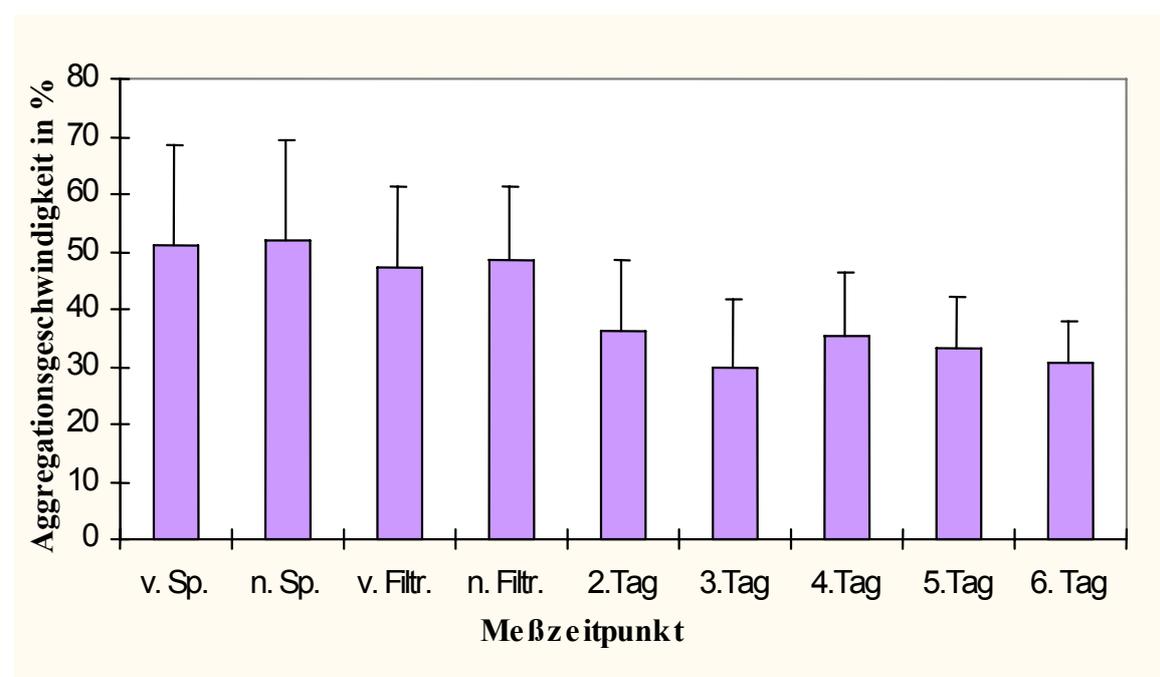
**Abbildung 31:** Der Verlauf der Mittelwerte und Standardabweichungen der induzierten Thrombozytenaggregation mit Collagen unter Spende, Filtration und Lagerung.

Die prozentuale Thrombozytenaggregation blieb im Verlauf der Lagerungsuntersuchungen konstant ohne gesicherte Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten.

	vor Sp.	n. Sp.	v. Filtr.	n. Filtr.	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
<b>MW</b>	80,18	84,06	85,75	84,92	78,47	66,33	77,29	82,67	83,40
<b>SD</b>	20,36	21,77	10,25	11,17	12,99	17,43	11,12	12,24	7,60
<b>n</b>	39	39	34	34	16	13	8	7	7

**Tabelle 23:** Die induzierte Thrombozytenaggregation mit Collagen: Mittelwerte und Standardabweichungen des Aggregationsendniveaus der Thrombozytenaggregation, sowie die Anzahl (n) der untersuchten Thrombozytenkonzentrate.

Die Geschwindigkeit der mit Collagen induzierten Thrombozytenaggregation verringerte sich von einem Wert von 50 % vor der Spende auf 36 % am zweiten Tag. Die Werte der folgenden Tage waren ebenfalls deutlich erniedrigt. Nach der Spende, sowie vor und nach der Filtration gab es keine wesentlichen Unterschiede gegenüber dem Ausgangswert (Abbildung 32, Tabelle 24).



**Abbildung 32:** Der Verlauf der Mittelwerte und Standardabweichungen der Geschwindigkeit der mit Collagen induzierten Thrombozytenaggregation unter Spende, Filtration und Lagerung.

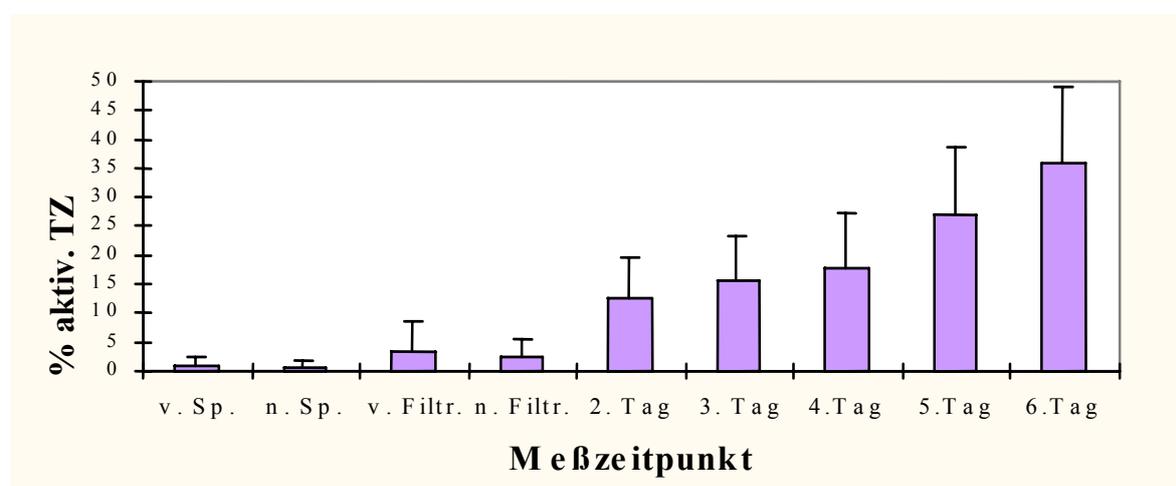
Es fand sich eine Abnahme der Aggregationsgeschwindigkeit ab dem zweiten Tag gegenüber dem Ausgangswert vor der Spende. Nach der Spende, sowie vor und nach der Filtration bestanden keine nennenswerten Unterschiede in der Aggregationsgeschwindigkeit im Vergleich zu den Ergebnissen vor der Spende.

	<b>vor Sp.</b>	<b>n. Sp.</b>	<b>v. Filtr.</b>	<b>n. Filtr.</b>	<b>2. Tag</b>	<b>3. Tag</b>	<b>4. Tag</b>	<b>5. Tag</b>	<b>6. Tag</b>
<b>MW</b>	50,97	52,03	47,39	48,53	36,28	29,58	35,50	33,29	30,50
<b>SD</b>	17,57	17,26	13,73	12,61	12,08	11,94	11,06	8,66	7,23
<b>n</b>	39	39	34	34	16	13	8	7	7

**Tabelle 24:** Die induzierte Thrombozytenaggregation mit Collagen: Mittelwerte und Standardabweichungen der Geschwindigkeit der Aggregation, sowie die Anzahl (n) der untersuchten Thrombozytenkonzentrate.

### 3.6.5 Durchflusszytometrische Bestimmung von Aktivierungsmarkern der Thrombozyten

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der flowzytometrischen Untersuchungen sind in den Abbildung 33 und 34 sowie in den Tabellen 25 und 26 dargestellt. Die GMP-140-Expression wurde durch zwei Parameter erfasst. In Abbildung 33 und Tabelle 25 sind die prozentualen Anteile aktivierter Thrombozyten angegeben, während in Abbildung 34 und Tabelle 26 die Absolutwerte der Fluoreszenzintensität wiedergegeben werden. Aus beiden Darstellungen ist erkennbar, dass die Aktivierung der Thrombozyten im Verlauf der Untersuchungen kontinuierlich zunahm. Bis auf die Wertepaare vor und nach der Spende, sowie vor und nach der Filtration unterschieden sich die Anteile aktivierter Thrombozyten, sowie die Absolutwerte der Fluoreszenzintensität deutlich untereinander ( $p < 0,05$ ).

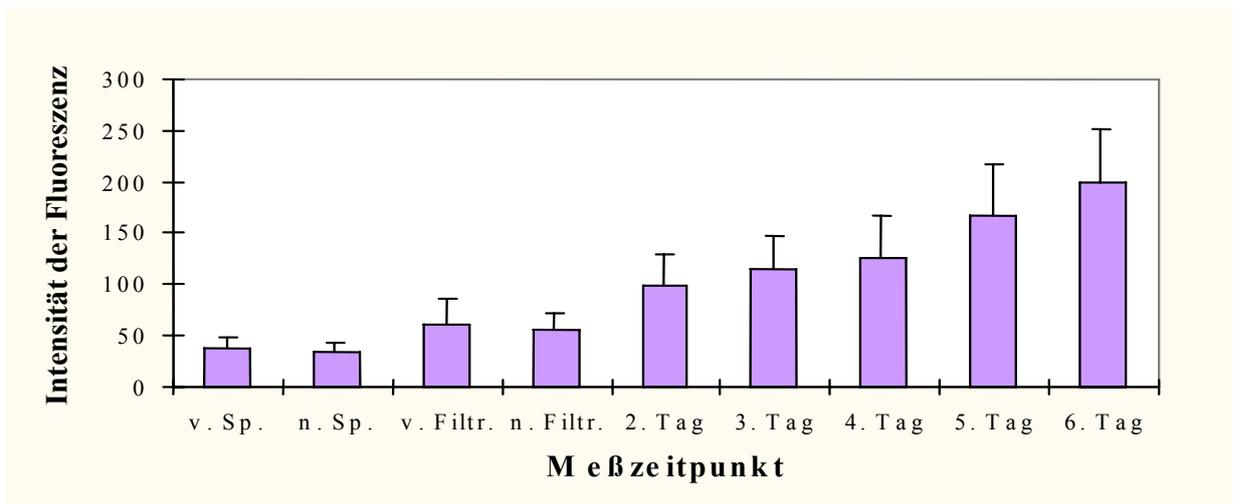


**Abbildung 33:** Das Verhalten der Mittelwerte und Standardabweichungen der GMP-140-Expression unter Spende, Filtration und Lagerung: Mittelwerte und Standardabweichung des prozentualen Anteils aktivierter Thrombozyten.

Die Zahl aktivierter Thrombozyten im Konzentrat erhöhte sich während der Lagerung von Tag zu Tag. Die Werte vor und nach der Spende sowie vor und nach der Filtration unterschieden sich unwesentlich.

	vor Sp.	n. Sp.	v. Filtr.	n. Filtr.	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
<b>MW</b>	0,96	0,76	3,24	2,58	12,58	15,62	18,69	26,89	35,78
<b>SD</b>	1,54	1,13	5,38	2,89	6,90	7,72	10,17	11,65	13,25
<b>n</b>	29	29	27	27	14	12	7	7	7

**Tabelle 25:** GMP-140-Expression unter Spende, Filtration und Lagerung: Mittelwerte und Standardabweichungen des prozentualen Anteils aktivierter Thrombozyten, sowie die Anzahl (n) der untersuchten Thrombozytenkonzentrate.



**Abbildung 34:** Das Verhalten der GMP-140-Expression unter Spende, Filtration und Lagerung: Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzintensität als Maß für die Aktivierung der Thrombozyten.

Die Aktivierung der Thrombozyten in den Konzentraten nahm von Tag zu Tag während der Lagerung sichtbar zu. Die Werte vor und nach der Spende, sowie vor und nach der Filtration unterschieden sich nicht bedeutsam.

	vor Sp.	n. Sp.	v. Filtr.	n. Filtr.	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
<b>MW</b>	37,80	34,73	61,77	54,82	99,41	115,51	128,7	167,87	199,74
<b>SD</b>	10,44	8,97	24,27	17,79	29,93	32,45	46,44	49,40	49,35
<b>n</b>	29	29	27	27	14	12	7	7	7

**Tabelle 26:** GMP-140-Expression unter Spende, Filtration und Lagerung: Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzintensität aktivierter Thrombozyten, sowie die Anzahl (n) der untersuchten Thrombozytenkonzentrate.

### 3.7 Lagerungsuntersuchung von Aphereseplasma

Am Ende der Lagerungsperiode von 15 Monaten war die Gesamtproteinkonzentration des gefrorenen Frischplasmas (GFP) höher ( $60.9 \pm 1.6$  g/dl) als zu Beginn ( $56.9 \pm 1.5$  g/dl), unabhängig vom verwendeten Spendeverfahren.

Die Blut-Zellzahlen sind in Tabelle 27 aufgeführt. Die deutschen Richtlinien zur Qualität von GFP schreiben vor, dass die roten Blutzellen (RBZ)  $< 6 \times 10^9/l$ , die weißen Blutzellen (WBZ)  $< 5 \times 10^8/l$  und die Blutplättchen (PLT)  $< 20 \times 10^9/l$  sein sollen (Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer und Paul-Ehrlich-Institut, 1996, 2000). Die Kontaminierung mit Thrombozyten war niedriger als nach den Empfehlungen des Europarates und der Weltgesundheitsorganisation gefordert wird (Council of Europe, 1995). Die GFP-M (s.u.) und GFP-P (s.u.), die mittels der Apheresesysteme MCS+ bzw. MCS 3p hergestellt wurden, sowie die manuell hergestellten GFP-B zeigten stets niedrigere Werte für die RBZ, WBZ und PLT als nach den Vorschriften verlangt wird. GFP-T (s.u.), welche mittels verschiedener Apheresesysteme hergestellt wurden, enthielten nur im Fall des

Apheresesystems MCS+ weniger RBZ und WBZ als nach den Vorschriften verlangt wird. Die beiden anderen Systeme enthielten Thrombozytenkonzentrationen oberhalb der erlaubten Grenzen.

GFP	RBZ 10 <sup>6</sup> /l	WBZ 10 <sup>6</sup> /l	PLT 10 <sup>9</sup> /l
Anforderungen	< 1000	< 500	< 20
GFP-T (MCS+)	17±5	10±4	12±3
GFP-T (MCS 3p)	16±12	4±3	16±13
GFP-T (Spectra)	9±4	2±4	30±15
GFP-T (AS 104)	16±11	7±6	46±26
GFP-M (MCS+)	8±3	2±1	10±6
GFP-P (MCS 3p)	6±3	6±6	9±4
GFP-B	5±2	27±23	13±5

**Tabelle 27:** Blutzellzahlen in GFP, hergestellt mit verschiedenen Multikomponentenapheresesystemen, Plasmapherese, sowie aus manuell gewonnenen Blutspenden (Mittelwerte ± SD).

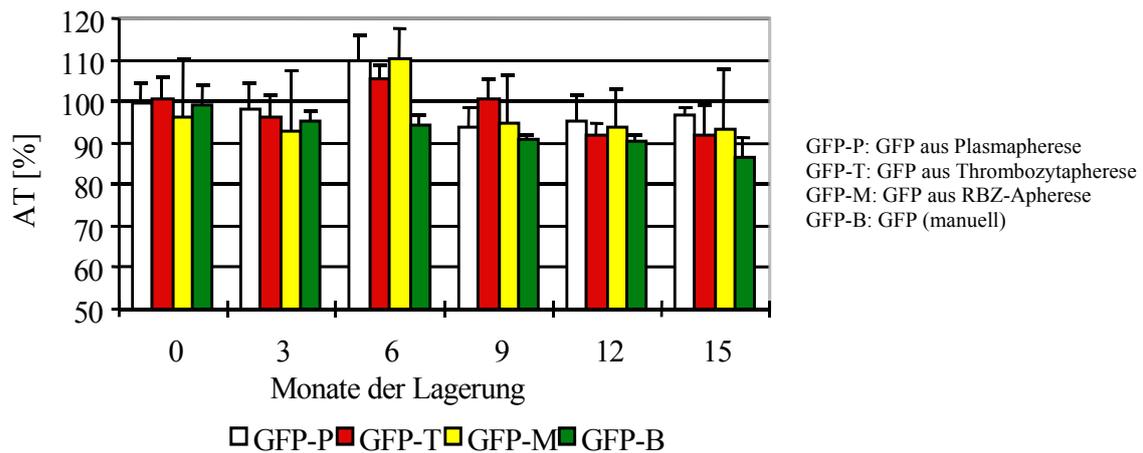
Da sich die Werte der verwendeten vier Apheresesysteme nicht signifikant unterschieden, wurden sie zusammengefasst und als ein Mittelwert für das GFP-T dargestellt.

Die Ausgangswerte für Antithrombin (AT) und Faktor VIII vor dem Einfrieren der Plasmen sind in Tabelle 28 angegeben. Sie befanden sich im Normalbereich gesunder Personen und zeigten keine bedeutsamen Unterschiede in Abhängigkeit von der Separationsmethode.

GFP	Faktor VIII:c [%]	AT [%]
GFP-T	119,3±4,6	100,3±5,5
GFP-M	126,7±2,5	96,0±14,4
GFP-P	117,7±25,0	99,7±4,9
GFP-B	125,7±16,3	99,0±5,2

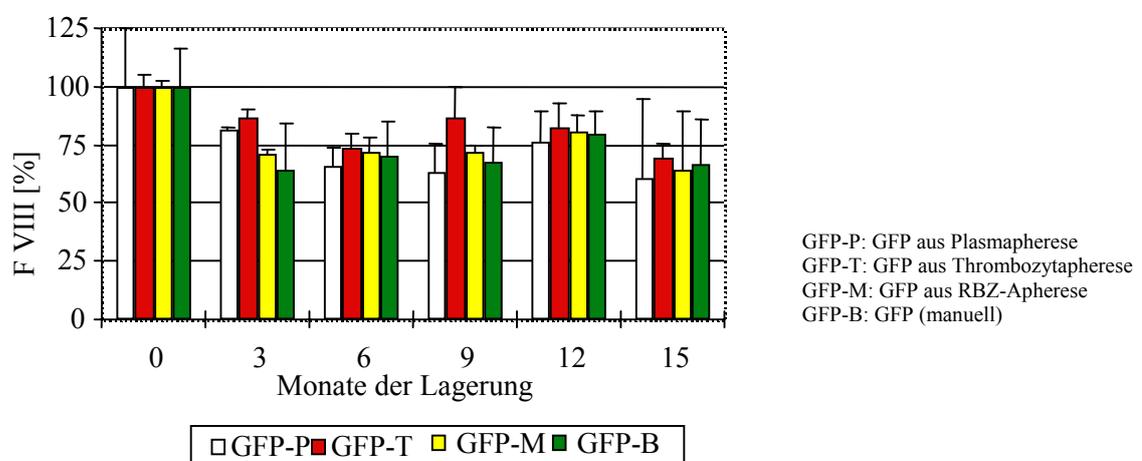
**Tabelle 28:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Ausgangswerte von Faktor VIII und AT in Plasmen, die mittels Multikomponentenapherese, Plasmapherese und aus manuellen Spenden hergestellt wurden.

Die Mittelwerte der Aktivitäten von AT in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bei unter  $-30^{\circ}\text{C}$  sind in Abbildung 35 dargestellt. Am Ende der 15 monatigen Lagerungsperiode wiesen alle untersuchten Aphereseplasmen Aktivitäten  $> 90\%$  des Ausgangswertes auf. Die Unterschiede zwischen den AT Werten der GFP, die mittels Thrombozytapherese, RBZ-Apherese oder Plasmapherese hergestellt wurden, waren unwesentlich. Die manuell hergestellten GFP-B zeigten eine minimal reduzierte Faktor-VIII-Aktivität nach 15 Monaten Lagerung im Vergleich mit den Aphereseplasmen.



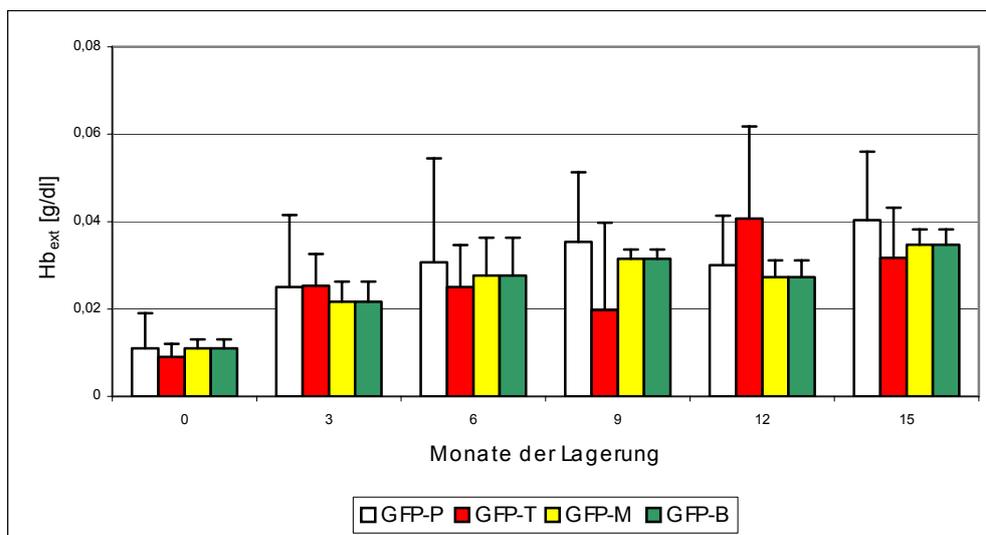
**Abbildung 35:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Aktivität von Antithrombin während der Lagerung, bis zu 15 Monate bei Temperaturen  $< -30^{\circ}\text{C}$ .

Die Mittelwerte der Aktivität von Faktor VIII in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer sind in Abbildung 36 dargestellt. Zwischen den Werten der mittels der verschiedenen Apheresesysteme hergestellten GFP konnten an keinem der Untersuchungszeitpunkte deutliche Unterschiede festgestellt werden.



**Abbildung 36:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Aktivität von Faktor VIII während der Lagerung, bis zu 15 Monate bei Temperaturen  $< -30^{\circ}\text{C}$ .

Das externe Hämoglobin ( $Hb_{ex}$ ) wird als ein Maß für die Qualität des Separationsprozesses angesehen. Es spiegelt die Zahl an hämolysierten Erythrozyten nach dem Einfrieren und Wiederauftauen des Plasmas wider. Die Ausgangswerte von  $Hb_{ex}$  unterschieden sich auf einem sehr niedrigen Niveau nicht deutlich (Abbildung 37). Die Standardabweichung war ziemlich groß im Vergleich zu den Mittelwerten, was auf die sehr niedrigen Absolutwerte im Plasma zurückzuführen ist. Die Konzentration von  $Hb_{ex}$  war nach dem Einfrieren und Wiederauftauen höher im Vergleich zu den Ausgangswerten, jedoch ohne bedeutsame Unterschiede zwischen Plasmen unterschiedlicher Herstellungsverfahren und Lagerungszeiten.



**Abbildung 37:** Mittelwerte und Standardabweichungen des externen Hämoglobins ( $Hb_{ex}$ ):  
 GFP-P: GFP aus Plasmapherese  
 GFP-T: GFP aus Thrombozytapherese  
 GFP-M: GFP aus RBZ-Apherese  
 GFP-B: GFP (manuell).

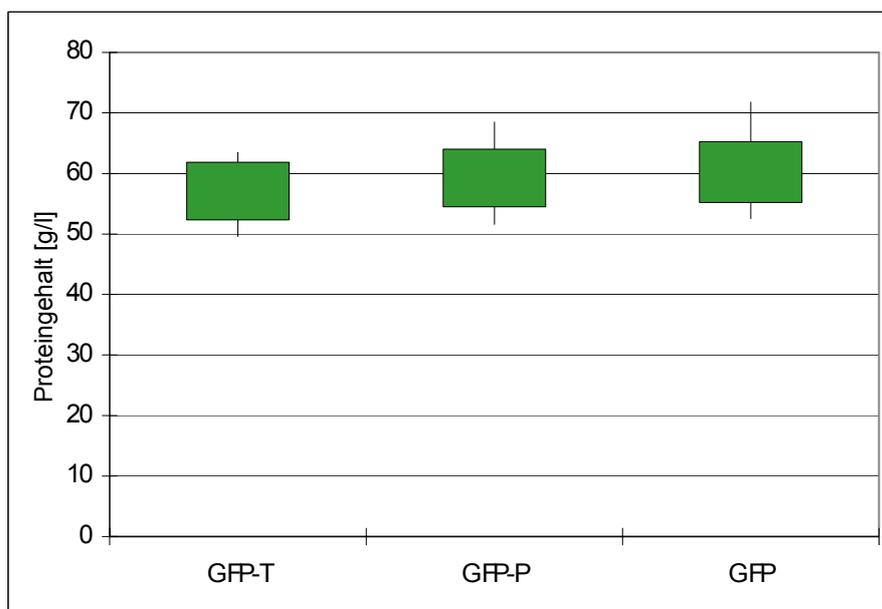
Das bei der Thrombozytapherese gesammelte Plasma wies Resultate auf, die mit denen von GFP vergleichbar waren, das aus Plasmapherese, RBZ-Apherese oder manuell gewonnenen Vollblutspenden hergestellt wurde. Alle untersuchten GFP erfüllten die Anforderungen, die sich aus den deutschen Richtlinien für die Qualität von Blutprodukten hinsichtlich der Enzymaktivitäten und des Gesamtproteingehaltes ergeben. Die Anforderungen an die Reinheit des Plasmas wurden in allen Fällen mit einer Ausnahme erreicht. Diese Ausnahme betraf die Thrombozytenzahlen in den während der Thrombozytapherese gesammelten GFP-T. Hier erfüllte nur das Apheresesystem MCS+ die Anforderung, dass weniger als  $2 \times 10^{10}$  Thrombozyten/l im Plasma enthalten sein dürfen.

### 3.8 Qualitätsuntersuchungen an Blutprodukten aus der Routineherstellung

#### 3.8.1 Gefrorenes Frischplasma (GFP)

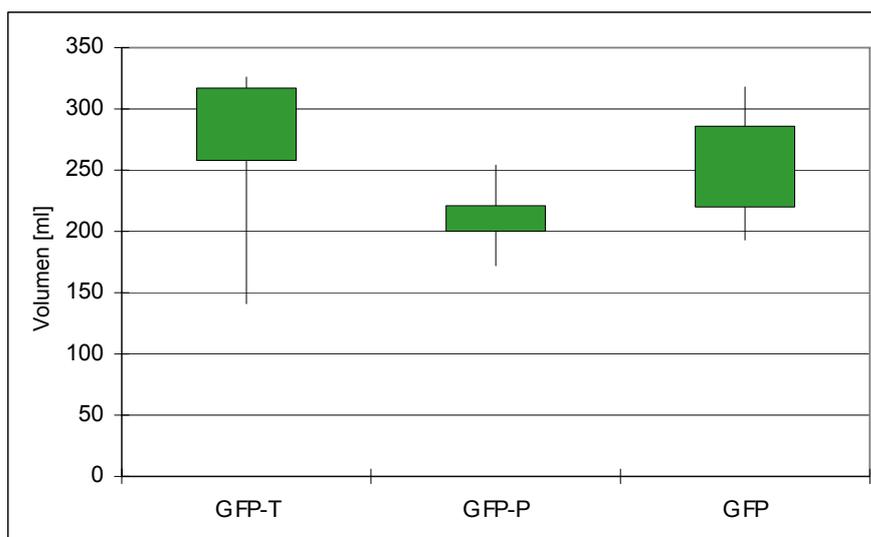
##### Gesamtproteingehalt

Die Vorgabe für den Gesamtproteingehalt der Plasmen ist  $> 48$  g/l, ein Wert, der bei sämtlichen untersuchten Produkten gegeben war. Zwischen den einzelnen Spendeverfahren waren keine sicheren Unterschiede nachweisbar (Abbildung 38).



**Abbildung 38:** Box-Plot des Gesamtproteingehaltes in Frischplasmen GFP, GFP-P und GFP-T, bestimmt in der Routinequalitätskontrolle im Zeitraum von November 1998 bis März 2000.

##### Packungsvolumen der GFP



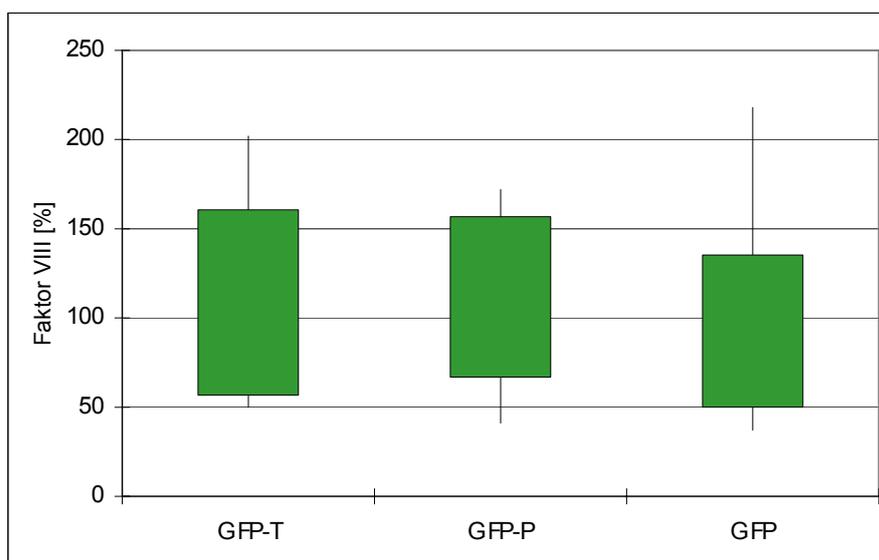
**Abbildung 39:** Box-Plot der Volumina der Frischplasmen GFP, GFP-P und GFP-T, bestimmt in der Routine-Qualitätskontrolle im Zeitraum von November 1998 bis März 2000.

Der zugelassene Volumenbereich für die verschiedenen Plasmaarten beträgt im Normalfall (keine Spezial-Packungsgrößen) für GFP 260±60 ml, für GFP-P 220±20 ml und für GFP-T ebenfalls 260±60 ml. Die geringere Packungsgröße bei den Plasmaphereseplasmen resultiert daraus, dass hier bis zu drei GFP-P von einem Spender gesammelt werden können.

Die manuell hergestellten Plasmen GFP, sowie die während der Thrombozytapherese hergestellten Plasmen GFP-T wiesen bis auf jeweils eine Ausnahme stets das zulässige Füllvolumen auf. Die mittels Plasmapherese hergestellten Plasmen GFP-P zeigten zwar eine deutlich geringere Variabilität der Volumina, aber aufgrund der engeren Vorgabe für die Toleranz der Volumina erfüllen einige Produkte die Qualitätsanforderungen nicht (Abbildung 39).

### 3.8.1.1 Faktor VIII-Aktivität

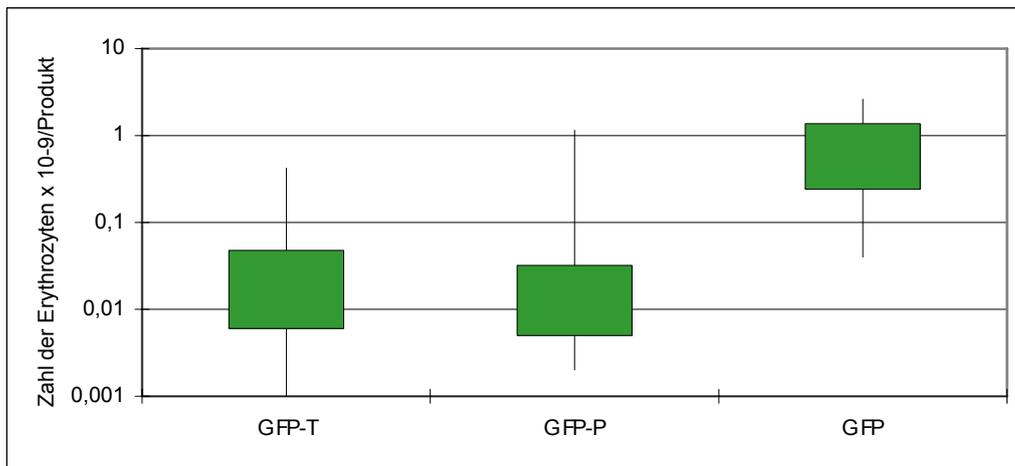
Die Faktor VIII-Aktivität ist einer der empfindlichsten Parameter, der besonders deutlich auf die Art des Auftauprozesses und die Lagerungsbedingungen reagiert. Sie soll nach dem Auftauen noch > 70 % des Ausgangswertes betragen. Die mittels Apherese gewonnenen Plasmen GFP-P und GFP-T wiesen in der Regel höhere Faktor VIII-Aktivitäten auf als die manuell hergestellten Plasmen (Abbildung 40). Möglicherweise ist dies auf die Art des verwendeten Stabilisators zurückzuführen.



**Abbildung 40:** Box-Plot des Wirkstoffgehaltes an Faktor VIII, bezogen auf den Ausgangswert der jeweiligen Frischplasmen nach 1 Jahr Lagerung bei unter - 30°C im Zeitraum zwischen November 1998 und März 2000.

### 3.8.1.2 Zahl der Resterythrozyten

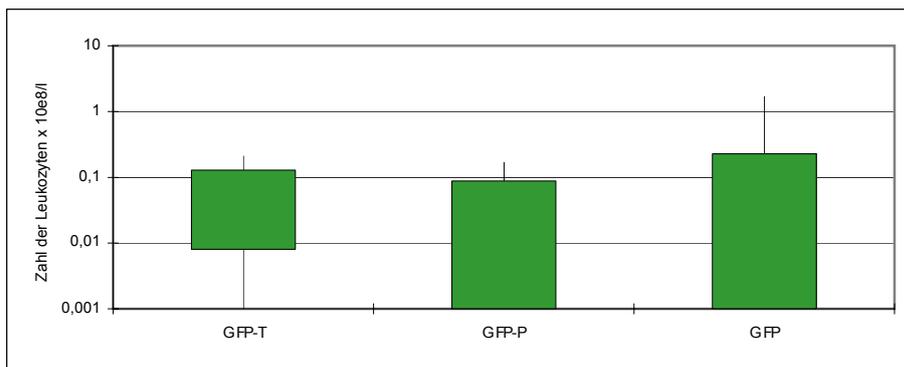
Der erlaubte Grenzwert an Resterythrozyten liegt bei  $< 20 \times 10^9/l$ . Sämtliche untersuchten Plasmen lagen deutlich unter diesem Grenzwert und erfüllten somit die Qualitätsanforderungen. Die mittels manueller Spende gewonnenen Plasmen GFP wiesen einen deutlich höheren Resterythrozytengehalt im Vergleich zu mittels Apherese hergestellten Plasmen auf. Dieser Unterschied war auf das bei den manuellen Spenden verwendete Zentrifugationsverfahren nach der Filtration des Vollblutes zurückzuführen und lag weit unter dem zulässigen Grenzwert (Abbildung 41).



**Abbildung 41:** Box-Plot der Zahl der Resterythrozyten in den Frischplasmen GFP, GFP-P und GFP-T, bestimmt in der Routine-Qualitätskontrolle im Zeitraum von November 1998 bis März 2000.

### 3.8.1.3 Restleukozytengehalt

Der erlaubte Grenzwert an Restleukozyten liegt bei  $< 5 \times 10^8/l$ . Die mittels Apherese hergestellten Plasmen GFP-P und GFP-T lagen in der Regel um eine Zehnerpotenz unter diesem Grenzwert. Die mittels konventioneller Blutspende hergestellten Plasmen GFP wiesen eine deutlich höhere Variabilität hinsichtlich der Leukozytenkontamination auf. Alle Produkte erfüllten die erforderlichen Qualitätsanforderungen.

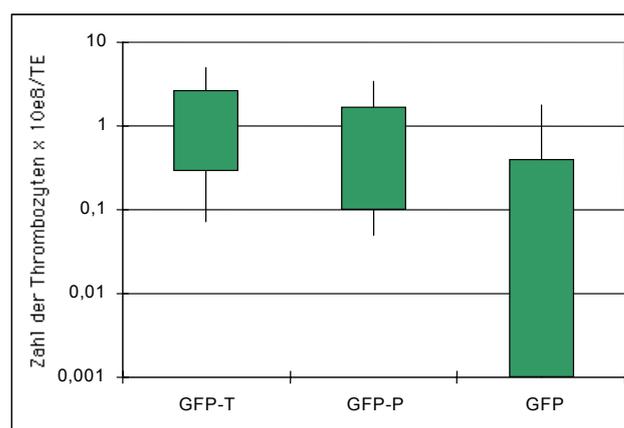


**Abbildung 42:** Box-Plot der Zahl der Rest-Leukozyten in den Frischplasmen GFP, GFP-P und GFP-T, bestimmt in der Routine-Qualitätskontrolle im Zeitraum von November 1998 bis März 2000.

Sichere Unterschiede in Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren waren nicht nachweisbar (Abbildung 42).

### 3.8.1.4 Restthrombozytengehalt

Die deutschen Richtlinien geben für den Restthrombozytengehalt in Plasmen einen Grenzwert von  $< 2 \times 10^{10}/l$  vor. Die durch manuelle Herstellung gewonnenen GFP wiesen bei sämtlichen untersuchten Produkten Thrombozytenzahlen auf, die kleiner als der Grenzwert waren. Die mittels Plasmapherese hergestellten GFP-P erfüllten die Anforderungen ebenfalls bis auf wenige Ausnahmen. Der Streubereich bei den Plasmen GFP-T, die parallel mit einem Thrombozytapheresekonzentrat hergestellt wurden, war größer als das bei den übrigen Plasmen festgestellt werden konnte (Abbildung 43). Die Überschreitung des Grenzwertes war maschinenabhängig (siehe auch Tabelle 27).



**Abbildung 43:** Box-Plot der Zahl der Restthrombozyten in den Frischplasmen GFP, GFP-P und GFP-T, bestimmt in der Routine-Qualitätskontrolle im Zeitraum von November 1998 bis März 2000.

Die Restthrombozytenzahl war für die manuell hergestellten GFP deutlich kleiner als für die mittels Apherese hergestellten GFP (Abbildung 43).

### 3.8.2 Thrombozytapherese- und Erythrozytenkonzentrate

Neben dem Wirkstoffgehalt, bei den Erythrozytenkonzentraten dem Hämatokrit und dem Hämoglobingehalt bzw. der Zahl der Thrombozyten bei den Thrombozytapheresekonzentraten, muss die Reinheit der Arzneimittel unmittelbar nach der Herstellung der Konzentrate stichprobenartig geprüft werden. Am Ende der Haltbarkeit der Erythrozytenkonzentrate muss die externe Hämoglobinkonzentration bestimmt und bezogen auf den aktuellen Hämatokrit die Hämolyserate berechnet werden. Für die Thrombozytapheresekonzentrate muss am Ende der Haltbarkeit der pH-Wert im Konzentrat bestimmt werden. Die erlaubten Grenzwerte für Erythrozytenkonzentrate und Thrombozytapheresekonzentrate sind in der Tabelle 29 angegeben.

Arzneimittel	Restleukozyten $10^6$	Restthrombozyten $10^9$	Resterythrozyten $10^9$
Erythrozytenkonzentrat	< 1/Produkt		
Thrombozytenkonzentrat	< 1/Produkt		< 0,5/Produkt
GFP	< 500/l	< 20/l	< 6/l

**Tabelle 29:** Vorgaben für die Reinheit von Blutprodukten nach den Richtlinien (Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer und Paul-Ehrlich-Institut, 1996, 2000).

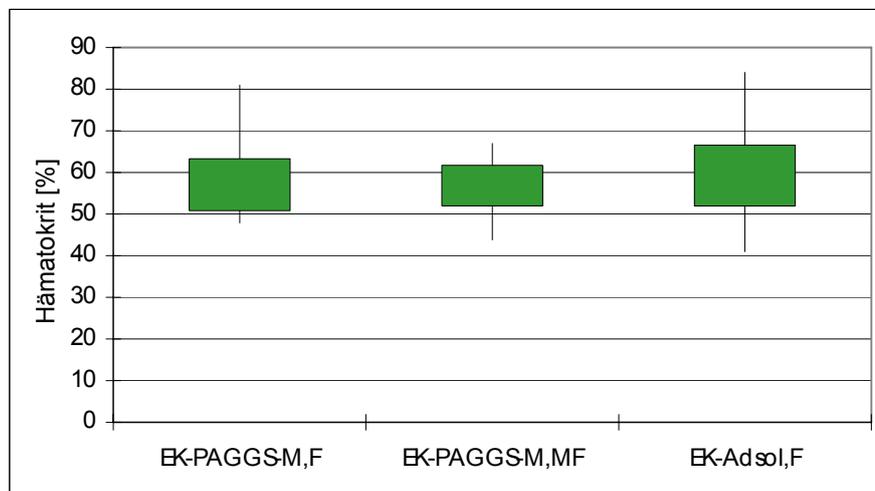
#### 3.8.2.1 Wirkstoffgehalt

Nach den gültigen Richtlinien (Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer und Paul-Ehrlich-Institut, 1996, 2000, 2003) ist für den Wirkstoffgehalt der Erythrozytenkonzentrate die Angabe sowohl des Hämatokrits als auch der Hämoglobinkonzentration vorgeschrieben. Da der Hämatokrit bei den Blutbildautomaten aus der Hämoglobinkonzentration und dem mittleren Erythrozytenvolumen berechnet wird, ist diese Größe mit einem größeren Fehler behaftet als die gemessene Hämoglobinkonzentration. Wie aus Tabelle 30 ersichtlich, in der die Parameter für die Regressionsgeraden (Anstieg; Hct=0 für Hb=0; Bestimmtheitsmaß) für die drei untersuchten Arzneimittel angegeben wurden, ist die Korrelation zwischen Hämatokrit und Hämoglobin erwartungsgemäß gut.

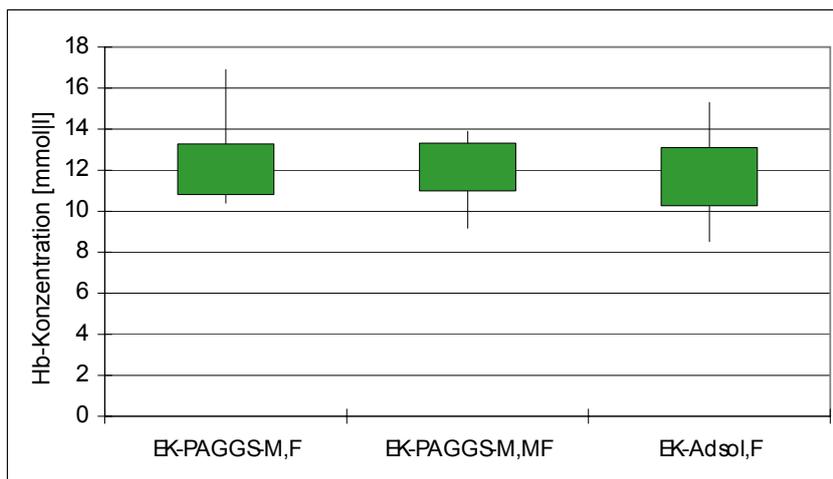
Arzneimittel	Anstieg der Regressionsgeraden	Bestimmtheitsmaß $r^2$	Zahl der Proben
EK-PAGGS-M, F	4,704	0,9050	164
EK-PAGGS-M, MF	4,720	0,6507	213
EK-Adsol, F	5,030	0,7667	190

**Table 30:** Abhängigkeit des Hämatokrits vom Hämoglobingehalt in Routine-Qualitätskontrollen von Erythrozytenkonzentraten. Bei der Berechnung der Regressionsgeraden wurde vorausgesetzt, dass der Schnittpunkt der Geraden im Nullpunkt liegt.

Aus den Abbildungen 44 und 45 ist ersichtlich, dass 90 % der untersuchten Arzneimittel unabhängig vom Herstellungsverfahren den geforderten Wirkstoffgehalt an Erythrozyten aufwiesen. Wie nicht anders zu erwarten, war der Streubereich im Wirkstoffgehalt bei den manuell hergestellten Erythrozytenkonzentraten EK-PAGGS-M, F und EK-Adsol, F signifikant größer als bei den mittels Apherese hergestellten EK-PAGGS-M, MF. Die Zahl der Unter- bzw. Überschreitungen des Wirkstoffgehaltes in den Erythrozytenkonzentraten war jedoch stets kleiner als zulässig.

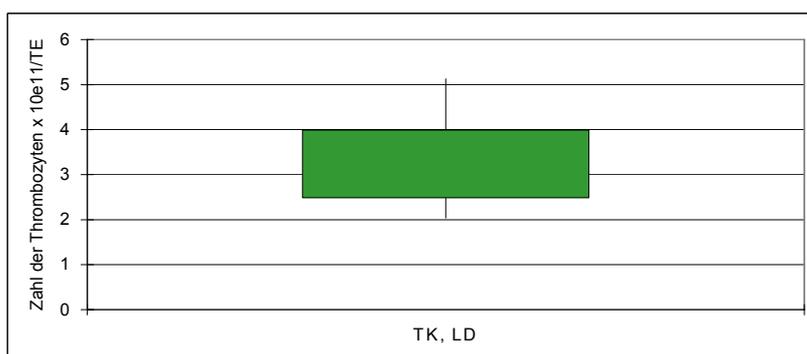


**Abbildung 44:** Box-Plot des Hämatokrits als Maß für den Wirkstoffgehalt in den Erythrozytenkonzentraten EK-PAGGS-M, F; EK-PAGGS-M, MF und EK-Adsol, F, bestimmt in der Routine-Qualitätskontrolle im Zeitraum von November 1998 bis März 2000.



**Abbildung 45:** Box-Plot der Hämoglobinkonzentration als Maß für den Wirkstoffgehalt in den Erythrozytenkonzentraten EK-PAGGS-M, F, EK-PAGGS-M, MF und EK-Adsol, F, bestimmt in der Routine-Qualitätskontrolle im Zeitraum von November 1998 bis März 2000.

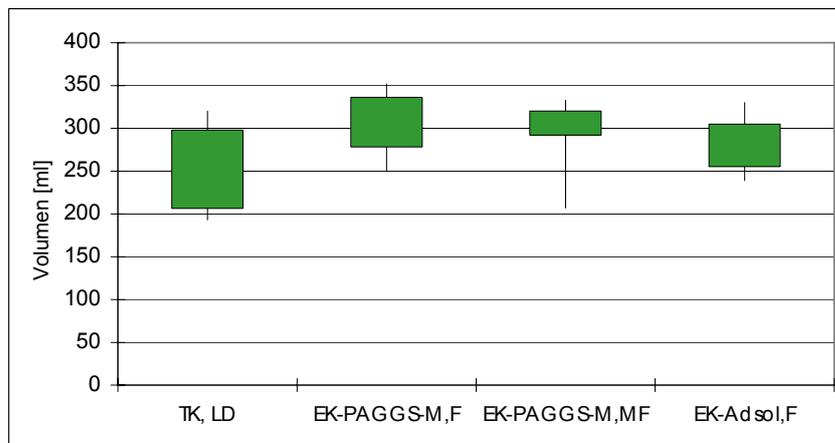
Der Wirkstoffgehalt der Thrombozytapheresekonzentrate unterschritt in keiner der untersuchten Proben die zulässige Zahl der Thrombozyten von  $2 \times 10^{11}$ /Produkt. Aus Abbildung 46 ist außerdem ersichtlich, dass in 5 % der Fälle der zulässige Grenzwert von  $4 \times 10^{11}$  Thrombozyten/Produkt überschritten wurde. Da die Information über den Thrombozytengehalt der Konzentrate unmittelbar nach der Herstellung des Thrombozytapheresekonzentrates vorlag, wurden diese Produkte geteilt, so dass nur Produkte zum Anwender gelangten, die den Anforderungen bezüglich des Wirkstoffgehaltes entsprechen.



**Abbildung 46:** Box-Plot der Zahl der Thrombozyten in Thrombozytapheresekonzentraten, bestimmt in der Routine-Qualitätskontrolle im Zeitraum von November 1998 bis März 2000. Die Konzentrate mit mehr als  $4 \times 10^{11}$  Thrombozyten/TE wurden geteilt.

### 3.8.2.2 Beutelvolumina

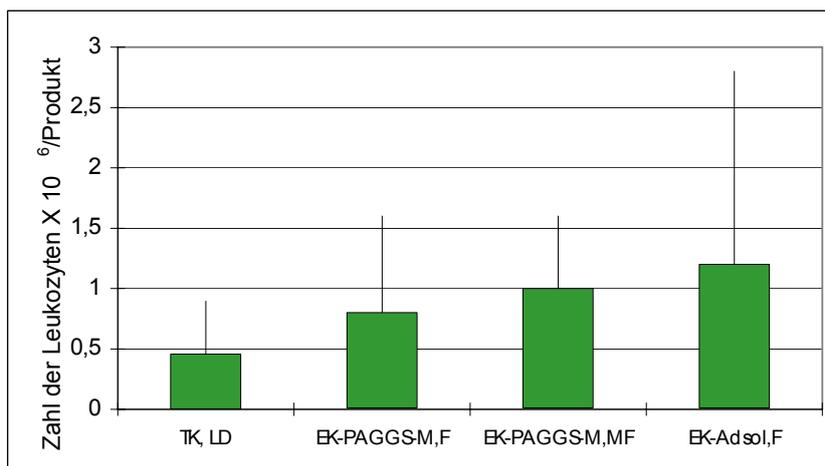
Die Einhaltung der vorgegebenen Volumina in Millilitern für die Thrombozytapherese- und Erythrozytenkonzentrate geht aus Abbildung 47 hervor, wobei wiederum die geringe Streubreite bei den mittels Apherese hergestellten Erythrozytenkonzentraten sichtbar wird. Bei den Thrombozytapheresekonzentraten ist der Streubereich per se größer, da das Endvolumen auch von der Ausgangszahl der Thrombozyten des Spenders abhängt und diese eine große Streuung aufweist.



**Abbildung 47:** Box-Plot der Volumina in Thrombozytapheresekonzentraten TK, LD und Erythrozytenkonzentraten EK-PAGGS-M, F, EK-PAGGS-M, MF und EK-Adsol, F bestimmt in der Routine-Qualitätskontrolle im Zeitraum von November 1998 bis März 2000.

### 3.8.2.3 Reinheit der Arzneimittel

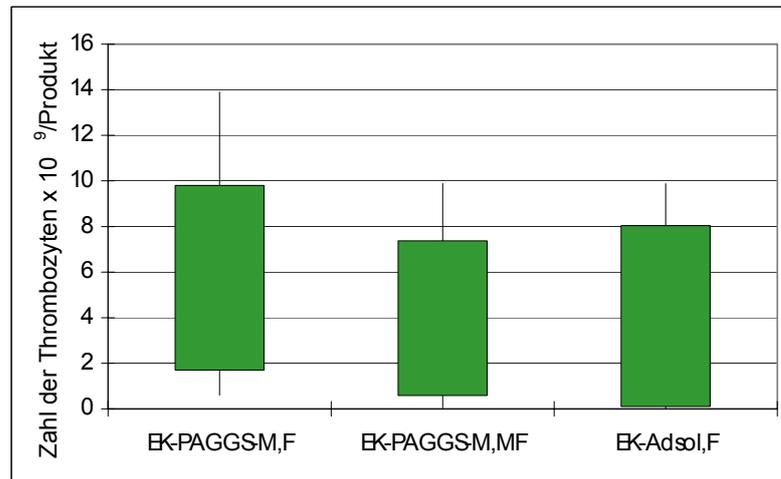
Die Reinheit der Arzneimittel wird durch die Kontamination mit Leukozyten, sowie mit Thrombozyten im Fall der Erythrozytenkonzentrate und mit Erythrozyten im Fall der Thrombozytapheresekonzentrate bestimmt. Die untersuchten Erythrozyten- und Thrombozytapheresekonzentrate waren alle leukozytendepletiert und erfüllten somit bereits zu diesem Zeitpunkt die Vorgaben des PEI (Paul-Ehrlich Institut, 1999) zur Leukozytendepletion von Blutprodukten, welche zum 01.10.2001 wirksam wurden.



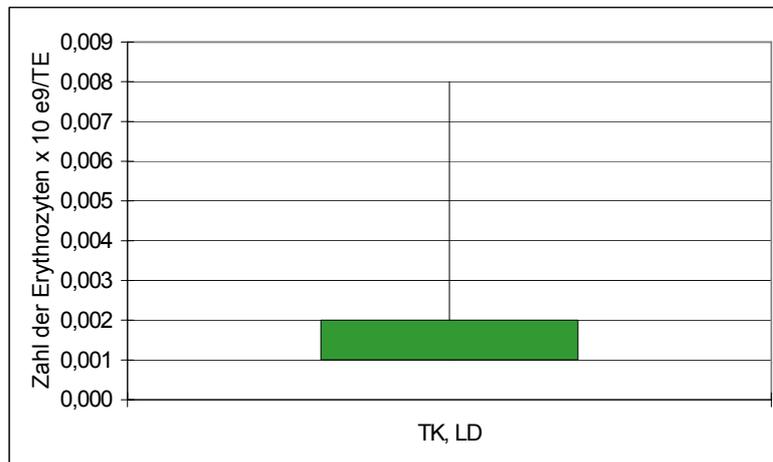
**Abbildung 48:** Box-Plot der Zahl der Rest-Leukozyten in Thrombozytapheresekonzentraten TK, LD und den Erythrozytenkonzentraten EK-PAGGS-M, F, EK-PAGGS-M, MF und EK-Adsol, F, bestimmt in der Routine-Qualitätskontrolle im Zeitraum von November 1998 bis März 2000.

Der erlaubte Grenzwert an Restleukozyten lag bei  $< 1 \times 10^6$ /Produkt. Dieser Wert wurde bei den Thrombozytapheresekonzentraten generell erreicht. Obwohl die Erythrozytenkonzentrate EK-PAGGS-M, F und EK-Adsol, F dem gleichen Herstellungsprozess unterworfen waren, unterschieden sich die Leukozytenzahlen in den untersuchten Konzentraten hinsichtlich des Streubereiches, was auf die verwendeten verschiedenen Filtersysteme zurückzuführen war. Insgesamt wurde jedoch nur bei 2 EK-Adsol, F der zulässige Grenzwert überschritten. Die mittels Erythrozytapherese hergestellten EK-PAGGS-M, MF erfüllten alle die Anforderungen bezüglich des Restleukozytengehaltes (Abbildung 48).

Die Zahl der kontaminierenden Thrombozyten in den Erythrozytenkonzentraten erreichte in keinem der untersuchten Konzentrate den oberen Grenzwert von  $2 \times 10^{10}$  Thrombozyten/l. Das Ergebnis wurde jedoch wesentlich von der Art der verwendeten Leukozytenfilter bestimmt (Abbildung 49). Während bei den Kaltblutfiltern (Filtration der Erythrozytenkonzentrate bei  $4^\circ\text{C}$ ) die Thrombozytenzahlen um eine Größenordnung unter dem zulässigen Grenzwert lagen, wiesen die Erythrozytenkonzentrate, die unmittelbar nach der Spende gefiltert wurden ( $30 \pm 3^\circ\text{C}$ ) deutlich höhere Thrombozytenzahlen auf. Dieser Effekt kann darauf zurückgeführt werden, dass die Ausgangszahl der Thrombozyten bei der Kaltblutfiltration bereits reduziert ist und die Zellen besser adhären.



**Abbildung 49:** Box-Plot der Zahl der kontaminierenden Thrombozyten in den Erythrozytenkonzentraten EK-PAGGS-M, F, EK-PAGGS-M, MF und EK-Adsol, F, bestimmt in der Routine-Qualitätskontrolle im Zeitraum von November 1998 bis März 2000.

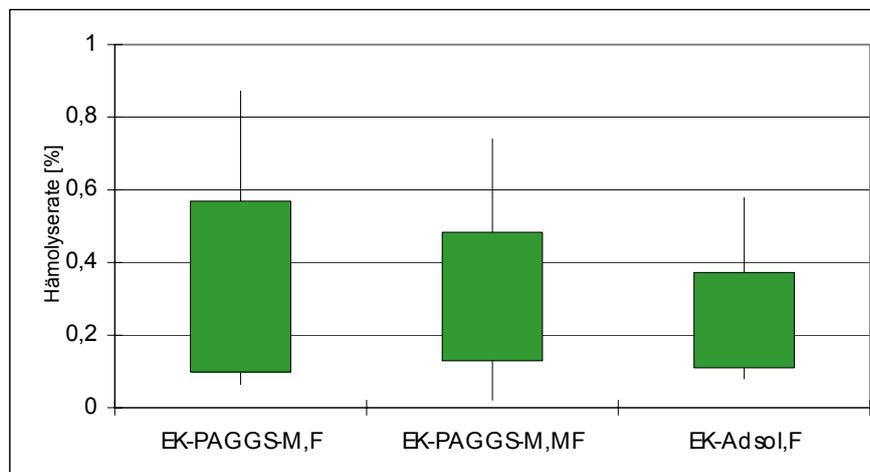


**Abbildung 50:** Box-Plot der Zahl der kontaminierenden Erythrozyten in Thrombozytapheresekonzentraten, bestimmt in der Routine-Qualitätskontrolle im Zeitraum von November 1998 bis März 2000.

Die Zahl der kontaminierenden Erythrozyten in Thrombozytapheresekonzentraten darf nach den gültigen Richtlinien  $3 \times 10^9$  Erythrozyten/Produkt betragen. Die in Abbildung 50 dargestellten Ergebnisse demonstrieren, dass 95 % der untersuchten Thrombozytapheresekonzentrate eine Kontamination mit Erythrozyten aufwiesen, welche deutlich unter dem zulässigen Grenzwert lag. Auch die restlichen 5 % der Konzentrate wiesen noch um 2 Zehnerpotenzen niedrigere Werte auf. Daraus wird deutlich, dass die Separation der Zellen im Aphereseverfahren sehr effizient erfolgt.

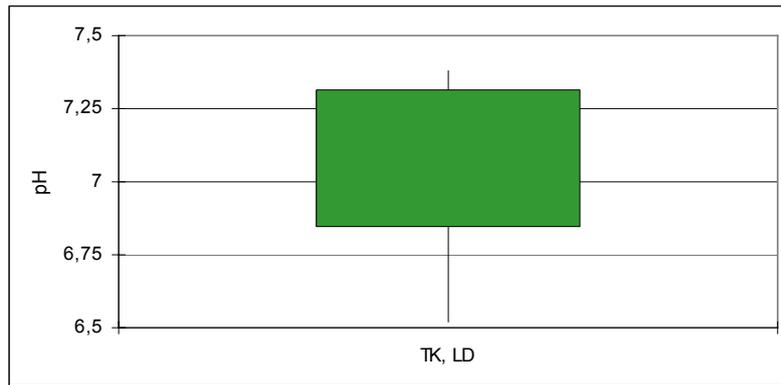
### 3.8.2.4 Qualitätsparameter

Die wesentlichen Qualitätsparameter am Ende der Haltbarkeitsperiode sind die Hämolyserate für die Erythrozytenkonzentrate bzw. der pH-Wert für die Thrombozytapheresekonzentrate. In Abbildung 51 spiegeln sich die bereits aus den Lagerungsuntersuchungen bekannten Ergebnisse wider. Die Hämolyserate ist unwesentlich abhängig vom verwendeten Lagerungsmedium. Bei den in Adsol gelagerten Erythrozyten, sowie bei den mittels Apherese hergestellten und in PAGGS-M gelagerten Erythrozytenkonzentraten wurde in keinem Fall eine Überschreitung der zulässigen Hämolyserate von 0,8 % nach dem 42. Lagerungstag festgestellt. Bei den manuell hergestellten und in PAGGS-M gelagerten Erythrozytenkonzentraten wurde in einem Fall eine Hämolyserate ermittelt, die den Grenzwert überschritt.



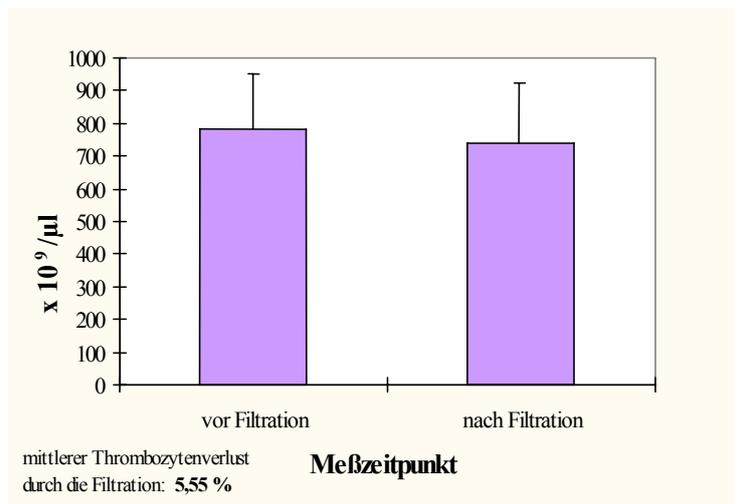
**Abbildung 51:** Box-Plot der Hämolyserate in Erythrozytenkonzentraten: EK-PAGGS-M, F, EK-PAGGS-M, MF und EK-Adsol, F, bestimmt in der Routine-Qualitätskontrolle im Zeitraum von November 1998 bis März 2000.

Da für diese Art der Erythrozytenkonzentrate eine größere Variabilität der Hämolyserate festgestellt wurde, muss angenommen werden, dass dies auf eine Variabilität der verschiedenen Chargen zurückzuführen ist. Weshalb dieser als Sammlungsschaden bezeichnete Effekt bei den in PAGGS-M gelagerten Erythrozyten größer ist als bei den in Adsol gelagerten Erythrozyten muss noch geklärt werden. Der pH-Wert in den Thrombozytapheresekonzentraten spiegelt die Stoffwechsellage der Thrombozyten und ihre Funktionsfähigkeit wider (Moroff 1991). Optimal ist ein pH-Wert um 7,0. Bereits bei einem Absinken auf Werte unter 6,2 ist eine erhöhte  $\beta$ -Thromboglobulinfreisetzung und abnorme Morphologie nachweisbar. Aus diesem Grund wurde auch der früher zulässige pH-Wert von 6,0 auf 6,5 erhöht. Die Vorgaben wurden von den untersuchten Thrombozytapheresekonzentraten ohne Ausnahme erfüllt (Abbildung 52).



**Abbildung 52:** Box-Plot des pH-Wertes in Thrombozytapheresekonzentraten am Ende der Haltbarkeit im Rahmen der Routine Qualitätskontrolle bestimmt.

Die Abbildung 53 zeigt den aus der Filtration resultierenden Thrombozytenverlust von im Mittel 5,55 %.



**Abbildung 53:** Die absolute Thrombozytenzahl vor und nach der Filtration.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die im Rahmen der Routine-Qualitätskontrolle im Zeitraum von November 1998 bis März 2000 untersuchten Arzneimittel sowohl hinsichtlich ihres Wirkstoffgehaltes, der Reinheit, als auch der am Ende der Haltbarkeit bestimmten Qualitätsparameter den Anforderungen genügten, die sich aus den Vorschriften des PEI ergeben (Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer und Paul-Ehrlich-Institut, 1996, 2000, 2003; Paul-Ehrlich Institut, 1999).