

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**Herstellung von Blutkomponenten
mittels Dialysemembranen und der Schwerkraft**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Sibylle Latza
aus Homburg/Saar

Gutachter : 1. Prof. Dr. med. A. Salama

2. Prof. Dr. med. R. Arnold

3. Prof. Dr. med. R. Blasczyk

Datum der Promotion: 01.06.2008

Inhaltsverzeichnis

A.	Einleitung	S.1
A.1	Historischer Einblick in die Entwicklung der Transfusionsmedizin	S.1-6
A.2	Aktuelle Standardverfahren der Blutkomponentengewinnung	S.7
A.2.1	Blutseparation durch Zentrifugation	S.7-11
A.2.2	Blutseparation durch Hämapherese	S.11
A.3	Aufgabenstellung	S.11-12
B.	Material und Methode	S.13
B.1	Material für den Versuchsaufbau	S.13
B.1.1	Aufbau und Funktion von zur Hämodialyse verwendeten Hollow Fiber Filtern	S.13-14
B.1.2	Nutzung des Hollow Fiber Filters für die Blutkomponentenherstellung	S.15-16
B.1.3.	Vollblutkonserven	S.16
B.1.4	Stabilisatorlösung und additive Lösung	S.16-17
B.1.5	Leukozytenfilter	S.17-18
B.1.6	Materialauflistung	S.19
B.2	Versuchsdurchführung	S.19-24
C.	Ergebnisse	S.25
C.1	Optimierungsversuche ohne Leukozytenfilter	S.25
C.1.1	Auswirkungen mehrmaligen Filtrierens auf den Hämatokrit	S.25
C.1.2	Findung der optimalen Abstandsverhältnisse innerhalb der Apparatur	S.25-27
C.1.3	Bestimmung einzuhaltender Abstände zur Vermeidung einer Hämolyse	S.27-28
C.2	Optimierungsversuche mit Leukozytenfilter	S.28
C.2.1	Leukozytenfiltration vor Versuchsbeginn	S.28
C.2.2	Durchführung der Leukozytenfiltration vor der ersten HF Filtration	S.29-30
C.2.3	Durchführung der Leukozytenfiltration nach der ersten HF Filtration	S.30
C.2.4	Durchführung der Leukozytenfiltration nach der zweiten HF Filtration	S.30
C.2.5	Optimale Positionen für den Leukozytenfilter innerhalb der Apparatur	S.30-31
C.2.6	Auswirkung der Flussrichtung des Blutes durch des HF Filter auf die Hämatokritwerte	S.31

C.2.7	Bestimmung des Restblutanteils im HF Filter	S.31-33
C.2.8	Anmerkungen zu den Hämatokritwerten nach Zugabe von Additivum	S.33-34
C.3	Optimierungsversuche zur Verbesserung der Plasmagewinnung, und zur Festlegung der Abstände des Plasmabeutels bzw. des Beutels 2F	S.34
C.3.1	Steigerung der Plasmagewinnung	S.34
C.3.2	Wahl der Abstände des Plasmabeutels bzw. des Beutels 2F	S.35
C.4	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse	S.36-38
D.	Diskussion	S.39
D.1	Optimierungsversuche	S.39-44
D.2	Vorteile der Hollow Fiber Methode	S.44-45
D.3	Zur Entwicklung der Hollow Fiber Methode	S.45-46
D.4	Ausblick	S.46
D.5	Zusammenfassung	S.47-48
E.	Literaturverzeichnis	S.49-54

A. Einleitung

A.1 Historischer Einblick in die Entwicklung der Transfusionsmedizin

Der Bedeutung des Blutes für den Menschen war man sich von jeher bewusst. So bemerkte Hippokrates: „Das Blut verleiht dem Menschen das Bewusstsein.“ (1). Mit der Erfindung von Werkzeugen und Waffen und damit der Ermöglichung des Jagens und Erlegen von Tieren, fand man den Zusammenhang des Lebens mit der „roten Flüssigkeit“ und die Folgen seines Verlusts bei Verletzungen heraus (2). Die Ägypter nahmen Blutbäder um sich zu erholen und die Römer tranken das Blut gefallener Gladiatoren zur Behandlung von Epilepsie (3). Die ursprüngliche Motivation, mit Bluttransfusionen zu beginnen, war der Glaube, dass junges und gesundes Blut Greise verjüngen und Kranke heilen könnte (4). Die erste, in der Geschichte vermutete Bluttransfusion wird in der Literatur häufig auf Papst Innocent VIII im Jahre 1492 zurückgeführt. Es ist davon auszugehen, dass diesem an den Folgen eines Schlaganfalls leidenden Mann das Blut dreier geopferter Jungen zu trinken gegeben wurde und es nicht zu einer „echten Blutübertragung“ gekommen ist (5). Die Frage wer sich als Erster in der Geschichte mit Bluttransfusionen beschäftigte, lässt sich nicht eindeutig beantworten. Magnus Pegel, Professor aus Rostock, veröffentlichte 1604 sein Buch über die Theorie der Bluttransfusion (6, 7). Die Beschreibung der Technik der Bluttransfusion geht auf Andreas Libavius zurück (8). Der aus dem sächsischen Halle stammende Chemiker und Physiker (9) berichtete 1615 über seine Methode, bei der die Arterie eines jungen Mannes „geöffnet“ und mit der „eröffneten“ Arterie eines alten Mannes über Silbertuben verbunden wurde. Auf diese Weise sollte dem geschwächten Alten die „Fontäne des Lebens“ zurückgegeben werden. Es ist nicht bekannt, ob diese Prozedur von Libavius auch in die Tat umgesetzt worden ist (10). Ob Transfusionen vor der Entdeckung des Blutkreislaufs 1628 durch Harvey überhaupt durchgeführt worden sind, lässt sich nicht eindeutig belegen.

Mit dem Wissen über die Zirkulation des Blutes wurde begonnen, geringe Mengen Blut, sowie Opium und andere Drogen intravenös zu injizieren (11). Die erste gut dokumentierte Blutübertragung von Tier zu Tier wurde von dem Physiologen Lower im Februar 1665 in England vorgenommen (12). Für die Blutübertragung wurde die Arteria Carotis eines Hundes mit der Vena Jugularis eines anderen Hundes verbunden. Dabei beobachtete man, dass es zu keinen negativen Reaktionen oder Wesensänderungen bei dem überlebenden Empfängertier kam (13). Hingegen waren Blutübertragungen zwischen Tieren verschiedener Gattungen mit dem Tod assoziiert. Die vermutlich erste Blutübertragung von einem Tier auf den Menschen wurde

am 15.06.1667 in Paris durch den Mathematiker und später königlichen Leibarzt J.-B. Denis und den Chirurg P. Emmerez durchgeführt. Die Wahl eines Tieres als Spender dürfte mit der Vorstellung zusammenhängen, dass das Blut von Tieren, besonders das des Lammes als rein galt. Die gewählte Technik entsprach der von Lower, bei welcher die A. cervicalis eines Lammes mit der V. cubitalis eines von Fieber geschwächten Jungen in Verbindung gebracht wurde. Auch Italien und Deutschland schlossen sich den Versuchen an. In Deutschland wurde die erste Bluttransfusion durch den Feldchirurgen des großen Kurfürsten M. Purmann und den Regimentchirurgen B. Kaufmann im Jahre 1668 durchgeführt. Dabei soll sich, nach der Blutübertragung von einem Lamm zu einem angeblich an Lepa Erkrankten, die Heilung angeschlossen haben. Natürlich kam es auch zu zahlreichen Todesfällen nach Bluttransfusionen, was zu Einschränkungen des Experimentierens führte. In Frankreich zeigte sich dieses in einem Urteilsspruch des französischen Gerichtshofs im Jahr 1668, wonach Transfusionen nur noch mit Einwilligung eines der Pariser Fakultät angehörenden Arztes erfolgen durften. Diese äußeren Erschwernisse und die noch großen Unsicherheiten im Umgang mit Transfusionen durch das geringe Wissen um die Gründe für die Misserfolge bei den Blutübertragungen führten dazu, dass die Experimente für fast 100 Jahre weitestgehend eingestellt wurden.

Das Thema der Transfusion wurde am Anfang des 19. Jahrhunderts von dem Londoner Geburtshelfer James Blundell wieder aufgegriffen. Bei seiner Arbeit war ihm aufgefallen, dass eine hohe Zahl an Frauen unter der Geburt verbluteten. Dies veranlasste ihn, Experimente mit Bluttransfusionen an Tieren durchzuführen, wobei er die Tiere zunächst ausbluten ließ, um sie dann über Injektionen mit Blut wieder „aufzufüllen“. Dabei entdeckte er, dass die Übertragung von Blut zwischen Tieren unterschiedlicher Spezies zum sicheren Tod des Empfängertiers führte (14). Er folgerte daraus, dass für die Blutübertragung auf den Menschen nur menschliches Blut verwendet werden sollte. Die Anwendung der Transfusionen blieb aber weiterhin ein unsicheres Verfahren.

Als Therapie bei drohendem Verbluten ergab sich ab 1879 jedoch die Möglichkeit der Anwendung von Kochsalzlösungen (15). So hatten Kronecker und Sander in Tierexperimenten festgestellt, dass die Aufrechterhaltung eines adäquaten Volumens für den Organismus bedeutender ist als die Gabe von Erythrozyten. Für eine anhaltende Erhöhung des Blutvolumens reichten reine Salzlösungen jedoch nicht aus. Der Physiologe Starlin entdeckte 1896, dass für den Erhalt eines bestimmten Volumens ein ausreichend hoher kolloidosmotischer Druck vorhanden sein muss (16). Dieser konnte durch den Saft einer Gummiarkazienart, bestehend aus verschiedenen Zuckern erreicht werden. Bis zum Anfang des 20. Jahrhunderts wurden Blutverluste somit mit Elektrolyt und Zuckerlösungen behandelt.

Dennoch wurden weiterhin Forschungen auf dem Gebiet der Blutübertragung unternommen. Das Phänomen der Blutagglutination wurde erstmals 1869 von Creite beschrieben (17), nachdem er Katzenserum zu Kaninchenblut gegeben hatte. Zunächst wurde diese Erscheinung als „bakterielle Agglutination“ interpretiert, da man vermutete, dass nur das Blut Kranker mit dem Gesunder agglutinierte (18). K. Landsteiner publizierte jedoch 1900 in seinen Forschungen über „Serum gesunder Menschen“ die Möglichkeit, dass die Agglutination auch eine individuelle Eigenschaft des Blutes sein könnte (19). Ein Jahr später folgerte er, seine Beobachtungen könnten über das Gelingen oder Missglücken der therapeutischen Bluttransfusionen zwischen Menschen Aufschluss geben (20). Seine Untersuchungen hatten die Entdeckung von 3 Isoagglutininen ergeben. Sturli und Decastello stellten ein weiteres Jahr später das Fehlen der Isoagglutinine in einigen Fällen fest und vervollständigten das Gesamtbild der 4 Gruppen des menschlichen Blutes, welches ab 1928 einheitlich als ABO-System bezeichnet wurde (21, 22). Für diese revolutionäre Entdeckung erhielt K. Landsteiner 1930 den Nobelpreis für Medizin (23).

Seit dem Durchführen von Blutübertragungen war auch das Problem der Blutgerinnung bekannt. Man bemerkte bei den Versuchen die Koagulation des Blutes in den Apparaturen und nahm die Gefahren der Gerinnselübertragung auf den Empfänger war. Dennoch wurde die Bedeutung der Blutgerinnung am Anfang des 19. Jahrhunderts noch recht unterschiedlich bewertet. Für J. Hunter und F. Megendie war die Gerinnung ein Hinweis für die Vitalität und Funktionstüchtigkeit des Blutes (24). Dagegen stellte die Gerinnung für Bischoff einen Zersetzungsbeginn und ein Zeichen sich auflösenden Lebens dar (25). Der Hunter Schüler W. Henson hatte schon 1771 die einzelnen Phasen der Blutgerinnung nach seinen Untersuchungen dokumentiert (26) und dabei festgestellt, dass Blut durch Stagnation im Körper gerinnt, ebenso durch die Berührung mit Luft. Er folgerte daraus, dass das Blut durch „Umrühren bzw. Quirlen“ flüssig bleibt (27). Um das 18. Jahrhundert konnten Parametier und Deyeux Fibrin als Gerinnungsstoff im Blut identifizieren und stellten seine Notwendigkeit für den Gerinnungsvorgang fest. Es bestand jedoch weiterhin keine Einigkeit darüber, ob nun defibriertes Blut oder Vollblut verwendet werden sollte. Die Befürworter des Einsatzes von defibriertem Blut, wie Bischoff, Müller und Brown- Sequard fanden heraus, dass die positive Wirkung des transfundierten Blutes auf den Empfänger allein von den Erythrozyten ausging und das Fibrin nur die Gefahr der Gerinnselbildung verstärkte. Sie stellten auch fest, dass durch das „Schlagen des Blutes“ die Blutkörperchen sich nicht veränderten (28). Die Meinungen blieben aber weiterhin geteilt. Für die Verwendung von defibriertem Blut, war auch der Physiologe Landois eingetreten (29).

Die zunächst zu Beginn des 17. Jahrhunderts für die Bluttransfusion angewandte Technik war die Methode der „direkten Bluttransfusion“. Dabei wurde eine Anastomose zwischen der A. radialis des Spenders mit der V. cubitalis des Empfängers hergestellt, worüber das Blut übertragen wurde (30). Die Nachteile waren jedoch enorm. Es kam zu einem erheblichen Zeitaufwand und die Blutübertragung war nur durch einen erfahrenen Operateur durchführbar. Weitere Probleme waren die Übertragung pathogener Erreger, die Unkontrollierbarkeit der übertragenen Blutmenge und der Verlust einer Arterie auf Seiten des Spenders. Der Chirurg Payr modifizierte die Technik, indem er eine in Formalin gehärtete und in Paraffin getränkte Kalbsarterie in die arterio-venöse Anastomose einfügte, was sich als positiv für den Zeit- und Arbeitsaufwand herausstellte (31). Ebenfalls variiert wurde die „direkte Methode“ von dem Hamburger Chirurgen Oehlecker. Die veno-venöse Transfusion wurde über eine in die Spender- bzw. Empfängervene eingelegte Glaskanüle und eine zwischengeschaltete Glasspritze portionsweise durchgeführt. Er entwickelte auch die „biologische Probe“ bei der dem Empfänger zunächst nur vorsichtig geringe Mengen Blut injiziert wurden, um Unverträglichkeiten rechtzeitig zu erkennen (32). Bis heute gilt diese Vorsicht im Umgang mit Transfusionen, die nur vom Arzt und unter Überwachung durchzuführen sind. Neben der Anwendung der „direkten Methode“ wurde unter der Notwendigkeit von Transfusionen im 1. Weltkrieg ein einfacheres Verfahren von Wederhake entwickelt (33), wobei er aus der eröffneten Spendervene 300-500 ml Blut in ein steriles Gefäß entnahm, durch „Schlagen“ mit Pinzetten defibrinierte und intravenös verabreichte. Diese, auch von den Briten und Amerikanern im Krieg verwendete Methode, wurde als „indirekte Bluttransfusion“ bezeichnet und stellte den Beginn der Verwendung von Blutkonserven da. Dem entnommenen Blut wurde außerdem Natriumcitrat beigelegt. Die gerinnungshemmende Wirkung von Natriumcitrat war seit 1914 bekannt (34) und konnte somit als Antikoagulanzen für die Blutkonservierung genutzt werden.

Die oben genannten Voraussetzungen ermöglichten den Ausbau des Transfusionswesens. Durch die Zunahme an durchgeführten Transfusionen stieg der Bedarf an Blut immer weiter an, so dass für genügend Blutspender gesorgt werden musste. So wurde in London 1921 der erste europäische Blutspendenachweis gegründet, dessen Aufgabe war, unbezahlte Spender, deren Blutgruppe vorher bestimmt wurden, auf Anfragen der Krankenhäuser zu vermitteln. Die erste Blutbank entstand 1937 in Chicago (35). Der Grundgedanke war, Blutkonserven auf Vorrat zu lagern wie Geld auf einer Bank, wobei keine finanziellen Gewinne damit beabsichtigt waren. Das Blut wurde in 500 ml Flaschen entnommen, welche noch einen Zusatz an Natriumcitratlösung enthielten und denen zusätzlich zwei Pilotröhrchen zur Blutgruppenbestimmung beigelegt waren. Die Konserven wurden bei einer Temperatur von 4-

6°C aufbewahrt (36) und konnten noch nach 4-5 Tage verwendet werden. Auch die Sowjetunion nahmen an dieser Entwicklung der Blutübertragung teil, so dass dort ab dem Jahre 1940 fast ausschließlich konserviertes Blut für die Transfusion verwendet wurde (37).

In Deutschland wurde noch längere Zeit an der Frischblutübertragung festgehalten. Ursachen für das Fortbestehen dieser Blutübertragungsmethode könnte die Überzeugung von der „einzigartigen Qualität unveränderten Blutes“ gewesen sein und das Verkennen der Bedeutung von organisierten Transfusionsdiensten wie sie im Ausland bereits eingeführt waren (38). Erst im Verlauf des 2. Weltkriegs wurde dieser Irrtum erkannt, als man die Blutversorgung an der Front mit Frischblutübertragungen nicht gewährleisten konnte. Ab 1940 wurde dann auch in Deutschland die ersten Transfusionen mit Blutkonserven durchgeführt (39). Mitte der 50er Jahre erfolgte der Übergang von der direkten Blutübertragung zur indirekten Methode mit Blutkonserven.

Die zur Blutkonservierung in den Jahren nach dem 2. Weltkrieg verwendeten Behältnisse waren meist Erlenmeyerkolben, welche mit einem Wattebausch verschlossen wurden. Bis in die 50er Jahre wurde das Blut über Stahlnadeln entnommen und in mit Gummistopfen verschließbaren Glasflaschen gesammelt. Die Materialien wurden nach dem Waschen und Sterilisieren wiederverwendet. Durch diese Mehrfachanwendungen kam es jedoch zu schweren Fieberreaktionen und Schüttelfrösten nach den Bluttransfusionen. Bei der Erforschung der Ursachen dieser Erscheinungen entdeckte Florence Seibert die Endotoxine (40). Sie fand heraus, dass diese fieberrregenden Substanzen, auch als Pyrogene bezeichnet, nur durch langes und starkes Erhitzen zerstört werden konnten. Erst die Erfindung von Blutbeutelssystemen für den einmaligen Gebrauch erbrachte einen deutlichen Rückgang der durch Verunreinigungen hervorgerufenen Nebenwirkungen bei den Blutempfängern. Diese, 1952 von Walter und Murphy entwickelten, in sich geschlossenen Beutelsysteme bestanden aus einer Nadel zur venösen Blutabnahme, einem Zwischenstück und dem anschließend zur Blutkonservierung benutzten Polyvinylbeutel (41). Seither werden geschlossene Blutbeutelssysteme zur Blutkonservierung verwendet.

Durch die von Loutit und Mollison entwickelte ACD-Lösung (acidum citricum-natrium citricum-dextrose) konnte die Haltbarkeit der Blutkonserven verbessert werden. Die Lösung wurde dem Blut in einem bestimmten Verhältnis beigelegt und dadurch die Lagerung der Konserven unter Kühlung für ca. 3 Wochen möglich (42). Ohne die Verwendung der Plastikbeutel wäre auch die Entwicklung im Bereich der Komponententherapie kaum möglich gewesen. Die Beutel, bestehend aus nicht mit biologischen Flüssigkeiten reagierendem

Polyvinyl, erlaubten durch ihre Flexibilität die Zentrifugation und Auftrennung des Blutes in seine Bestandteile.

In den letzten 50 Jahren wurde die Verwendung von Vollblutkonserven allmählich ersetzt durch die gezielte Therapie mit einzelnen Blutkomponenten (Erythrozytenkonzentrat, Thrombozytenkonzentrat und Plasma). Die Blutkomponententherapie hat zu einer Minimierung der transfusionsassoziierten Risiken geführt und die Lagerungszeiten für Blutprodukte erhöht. Die Wandlung in der Therapie von Vollbluttransfusionen zu der Übertragung nur einzelner Blutkomponenten wird auf die Zeit des 2. Weltkriegs datiert. Damals entwickelte Edwin J. Cohn die „kalte Ethanolmethode“ (43), womit es möglich wurde, Plasma zu fraktionieren und die Proteinbestandteile des Blutes wie Albumin, gamma-Globulin und Fibrinogen therapeutisch zu nutzen. Albumin und Plasma waren während des Krieges wichtige Therapeutika in der Behandlung des hämorrhagischen Kreislaufschocks (44). Auch die Verwendung von unfraktioniertem Plasma wurde durch den Einsatz von einzelnen Gerinnungsfaktoren weiter modifiziert. Dies war ein großer Erfolg in der Therapie der Hämophilie. Pool hatte 1965 den Faktor VIII entdeckt und diesen über „Kälteausfällung“ mit Hilfe des geschlossenen Beutelsystems aus dem Blut separiert (45). Das Wissen über das erhöhte Risiko der Übertragung von Syphiliserregern durch frisches noch warmes Blut hat den Schritt in Richtung Blutkomponententherapie ebenfalls vorangetrieben. Durch die Abkühlung und Lagerung des Blutes, bevor es transfundiert werden konnte, entstand aber ein erhöhter Verlust an funktionstüchtigen Gerinnungsfaktoren. Um die Gerinnungsfaktoren zu erhalten, wurden die Zellbestandteile des Blutes vom Plasma getrennt und das Plasma mit den Gerinnungsfaktoren schnellstmöglich eingefroren.

Die Gewinnung von Plasma mit Hilfe einer Zentrifuge wurde erstmals 1944 von Tui et al. beschrieben (46). Diese Methode wurde durch Judson weiterentwickelt, der 1968 die „geschlossene Zentrifuge“ erfand (47). Das war der Beginn des Hämapherese-Verfahrens, bei dem das Blut während der Spende in seine einzelnen Blutkomponenten aufgetrennt wird und die nicht benötigten Bestandteile noch im Verlauf der Spende zurückgegeben werden können. Die Zentrifugation und zu einem geringen Anteil die Hämapherese stellen zur Zeit die Standardverfahren der Blutkomponentenherstellung dar.

A.2 Aktuelle Standardverfahren der Blutkomponentengewinnung

A.2.1 Blutseparation durch Zentrifugation

Nachdem die Spendefähigkeit hinreichend geklärt wurde, wird eine Spendervene durch das Entnahmepersonal gestaut, desinfiziert und dann punktiert. Die Kanüle ist steril über einen Schlauch mit dem Beutelsystem verbunden. Vor der Füllung des für die Vollblutkonserve vorgesehenen Beutels, werden ca. 20 ml Blut in einen „predonation sample“ Beutel gefüllt (48). Für die dann folgende Spende wird ein Blutvolumen von ca. 495 ml entnommen.

Der auf der Mischwaage liegende Beutel zum Sammeln des Vollblutes ist mit 70 ml CPD Stabilisatorlösung gefüllt, welche sich aus Citrat zur Verhinderung der Gerinnung, Phosphatpuffer zur PH-Stabilisierung und Dextrose zur Energiebereitstellung zusammensetzt. Während der Spende werden Vollblut und Stabilisator über die Mischwaage gleichmäßig vermengt.

Für die „Sammlung“ des Blutes wird in der Regel ein Vierfachbeutelssystem verwendet (s. Abb. 1). Dieses geschlossene Beutelsystem ist steril über Schläuche verbunden und bietet die Möglichkeit, das Vollblut in die verschiedenen Blutkomponenten aufzutrennen.

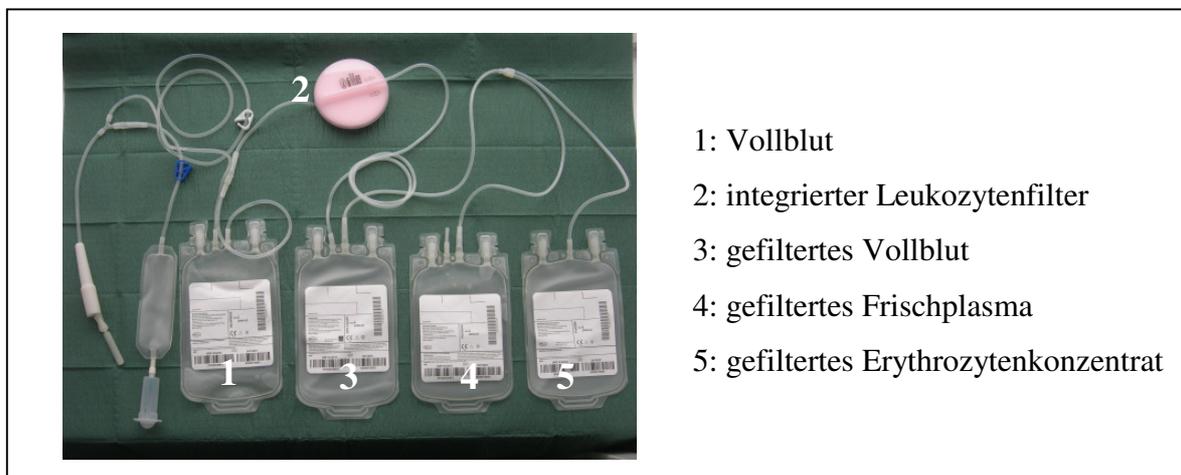


Abbildung 1: Vierfachbeutelssystem

Der Beendigung der Spende folgt das Abschweißen des Entnahmeschlauchs und die Entfernung der Kanüle. Die Vollblutkonserve steht dann zur weiteren Aufbereitung zur Verfügung.

Die nun folgenden Schritte müssen innerhalb von 24 Stunden (48) abgeschlossen sein. Werden bis zur Herstellung der Blutkomponenten über 8 Stunden benötigt, sollten sich die Blutprodukte bei Temperaturen von $+ 4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ für die Erythrozytenkonzentratherstellung oder $+ 22^{\circ}\text{C}$

+/- 2°C für die Thrombozytenkonzentratherstellung (48) befinden. Da ein großer Teil der Blutspenden außerhalb der Blutspendezentralen gewonnen wird, müssen bis zur Herstellung der Blutkomponenten Transportwege und Zeitverzögerungen hingenommen werden.

Die erforderliche Leukozytendepletion erfolgt mit einem Leukozytenfilter und kann vor oder nach der Zentrifugation durchgeführt werden. Da nicht nur die Leukozyten, sondern auch ein großer Teil der Thrombozyten durch den Leukozytenfilter entfernt werden, erfolgt bei der Thrombozytenkonzentratherstellung aus Vollblut die Leukozytenfiltration nach der Zentrifugation.

Der Leukozytenfilter ist von den Herstellern der jeweiligen Beutelsysteme bereits unterhalb des Vollblutbeutels integriert worden. Für die Leukozytenfiltration wird der mit dem Beutelsystem verbundene Vollblutbeutel an einer Aufhängevorrichtung angebracht. Durch Öffnen des Ventils vor dem Leukozytenfilter wird die Filtration gestartet (s. Abb. 2). Nachdem das gesamte Blut den Filter passiert hat, wird der Beutel mit dem gefilterten Blut entlüftet und abgeschweißt.



Abbildung 2: Leukozytendepletion über den Leukozytenfilter

Die Zentrifugation erfolgt nach Einlage der Blutkonserve in den Rotator. Rotationsgeschwindigkeit, Zentrifugationsdauer und Temperatur werden durch die zu separierenden Blutkomponenten und das verwendete Beutelsystem bestimmt. Zur Auftrennung des Vollbluts in Erythrozytenkonzentrat und Frischplasma werden in der Regel eine Zentrifugalbeschleunigung von 4000 bis 5000 x g und eine Zentrifugationsdauer von ca. 20 Minuten verwendet.

Durch das Zentrifugieren des Blutes sedimentieren die einzelnen Blutbestandteile entsprechend der Svedberg- Gleichung (s. Gleichung 1) in unterschiedlichen Geschwindigkeiten.

Svedberg-Gleichung:

$$V = \frac{2/9 \times W^2 \times R [d (Zellen) - d (Plasma)] \times r^2}{\eta_t}$$

V= Sedimentationsgeschwindigkeit ; W= Winkelgeschwindigkeit ; R= Abstand der Blutzellen zur Drehachse ;
d = spezifisches Gewicht ; r = Radius der Blutzellen ; η_t = Viskosität des Mediums bei t° C

Gleichung 1 : Svedberg- Gleichung

Am Anfang der Zentrifugation beeinflusst vor allem die Zellgröße die Schichtung der einzelnen Blutzellreihen (s. Abb.3). Dadurch sinken die Leukozyten, als Zellen mit dem größten Radius, am schnellsten ab. Es folgen die Erythrozyten und schließlich als kleinste Zellbestandteile die Thrombozyten.

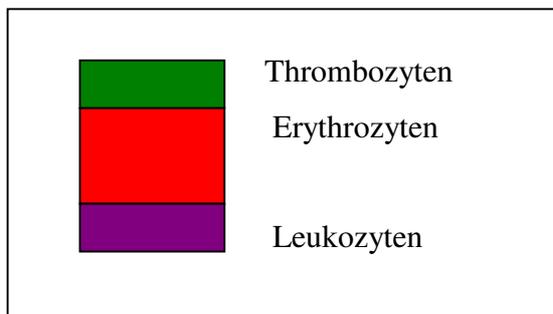


Abbildung 3: Die erste Phase der Zellschichtung erfolgt nach der Zellgröße

Der als nächstes auf die Zellschichtung Einfluss nehmende Faktor ist das spezifische Gewicht (s. Abb.4 S.10). Dadurch kommt es durch die Masse der Erythrozyten zum Hochdrücken der Leukozyten vom Beutelboden. Diese Umschichtung ist an eine Temperatur von ca. 20°C gebunden, wodurch die Viskosität der Erythrozyten beeinflusst wird.

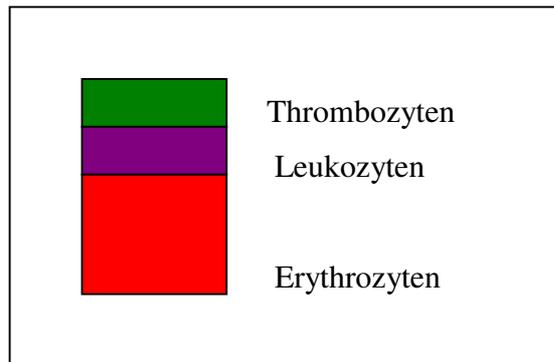


Abbildung 4: Die zweite Phase der Zellschichtung erfolgt nach dem spezifischen Gewicht

Bei noch nicht durchgeführter Leukozytendepletion enthält der Blutbeutel nach Abschluss der Zentrifugation die Blutbestandteile in folgender Reihenfolge: die oberste Schicht besteht aus Plasma, darunter befindet sich der „buffy coat“ aus den Thrombozyten und einem Teil der Leukozyten (Lymphozyten und Monozyten) und am Boden die Erythrozyten und die Granulozyten (s. Abb. 5). Ist die Leukozytendepletion vor der Zentrifugation erfolgt, sind die Leukozyten und der überwiegende Teil der Thrombozyten bereits entfernt worden. Durch die Entfernung der Thrombozyten und besonders der Leukozyten werden unerwünschte Reaktionen bei der Lagerung und der Transfusion (PH- Abfall während der Lagerung, Verstopfung der Transfusionsfilter durch große Zellaggregate, Nebenwirkungen durch die Transfusion) minimiert.

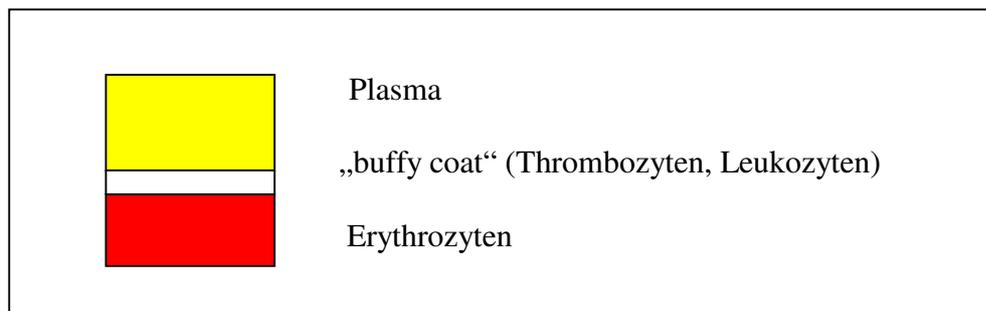


Abbildung 5: Schichtung der Blutbestandteile einer Blutkonserve nach der Zentrifugation (ohne vorherige Leukozytenfiltration)

Nachdem das Beutelsystem ohne die Zellschichten zu vermischen aus dem Rotator entnommen wurde, schließt sich die Trennung der Schichten voneinander an. Früher wurde die Separation noch mit Hilfe einer manuellen Federpresse durchgeführt. Heute geschieht dieser Vorgang teilweise automatisch. Die zentrifugierte Vollblutkonserve wird in den Separator eingelegt, welcher über optische Detektoren die Trennschicht zwischen Plasma und Zellen ermittelt und diese dann jeweils in die verbundenen Beutel abpresst. Das leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrat wird in additive Lösung resuspendiert und von dem Plasmabeutel getrennt. Das Plasma wird für die Lagerung unter einer Temperatur von -30°C tiefgefroren. Die Erythrozytenkonzentrate werden, bei einer Temperatur von $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ gelagert und sind dann bis zu 49 Tage haltbar.

A.2.2 Blutseparation durch Hämapherese

Eine weitere Möglichkeit einzelne Blutkomponenten zu gewinnen, ist die Apherese. Bei dieser Methode wird das Blut während der Spende in seine Blutkomponenten getrennt und dem Spender die nicht benötigten Blutbestandteile zurückgegeben. Die Separation des Blutes erfolgt auch bei der Hämapherese mit Hilfe der Zentrifugation und es werden ein diskontinuierliches von einem kontinuierlichen Verfahren unterschieden. Bei der diskontinuierlichen Methode wird dem Spender zunächst maximal 15% seines Blutvolumens entnommen, dieses in die Blutkomponenten separiert und die nicht gebrauchten Blutanteile anschließend über die Kanüle zurückgegeben. Während des kontinuierlichen Verfahrens werden die nicht benötigten Blutbestandteile beständig unter der Blutspende zurück transfundiert.

A.3 Aufgabenstellung

Die heutigen Standardverfahren der Blutkomponentenherstellung weisen einige Nachteile auf. Der maschinelle Betrieb der Zentrifuge und Hämapherese ist an eine äußere Energiebereitstellung gebunden und erfordert hohe Anschaffungs- bzw. Unterhaltskosten. Die praktische Umsetzung der Blutseparation ist nur durch geschultes Personal durchführbar. Außerdem ist die Blutfraktionierung häufig mit einer Zeitverzögerung verbunden, da ein beträchtlicher Teil der Blutkonserven mittels mobilen Spendestationen (Fahrzeugen) entnommen wird. Die Blutkonserven werden zunächst über große Strecken zu den Hauptblutspendezentren transportiert, bevor dort die Fraktionierung in Blutkomponenten durchgeführt werden kann.

Der Grundgedanke, mit den Versuchen zu beginnen, war eine alternative Methode zu Zentrifuge und Hämapherese zu schaffen, um bei gleichen Anforderungen an das Endprodukt (s. Tab. 1) mit recht einfachen Mitteln und ohne die Benötigung von Energiequellen die Herstellung von Blutkomponenten zu ermöglichen.

Tabelle 1: Qualitätskontrolle für leukozytendepletiertes Erythrozytenkonzentrat in Additivlösung (Auszug aus den Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Gewinnung von Blutprodukten 2005)

Volumen	gemäß Zulassung
Hämatokrit	0,50-0,70 l/l
Gesamt-Hb	≥ 40 g/Einheit ²³ oder $\geq 2,48$ mmol/Einheit
%Hämolyse	<0,8% der Erythrozytenmasse
Restleukozyten	$<1 \times 10^6$ /Einheit
Visuelle Kontrolle	Beutel unversehrt, keine sichtbare Hämolyse
Sterilität	steril

Eine Möglichkeit dieses Ziel zu erreichen, ergab sich durch den für die Hämodialyse verwendeten Hollow-Fiber-Filter, dessen Filtereigenschaft auf der Ausnutzung der Schwerkraft beruht. Aus diesem Filter und Teilen des geschlossenen Beutelsystems wurde eine Apparatur für die Durchführung der Versuche zur Blutkomponentengewinnung konstruiert.

B. Material und Methode

B.1 Material für den Versuchsaufbau

B.1.1 Aufbau und Funktion von zur Hämodialyse verwendeten Hollow Fiber Filtern

Das Äußere eines Hollow Fiber Filters lässt sich durch die Form einer Säule beschreiben, in deren Inneren sich die Hohlfasern (Hollow Fiber) befinden (s. Abb. 6). Diese 500 bis mehrere tausend parallel zueinander angeordneten Hohlfasern können zusammen einen Innendurchmesser von 330 bis 770 μm bilden. An der Säule befinden sich drei Anschlüsse, von denen zwei in Verbindung mit den Hohlfasern stehen und den Blutfluss durch die Säule ermöglichen. Ein weiterer Anschluss mündet in den mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllten Außenraum der Säule.

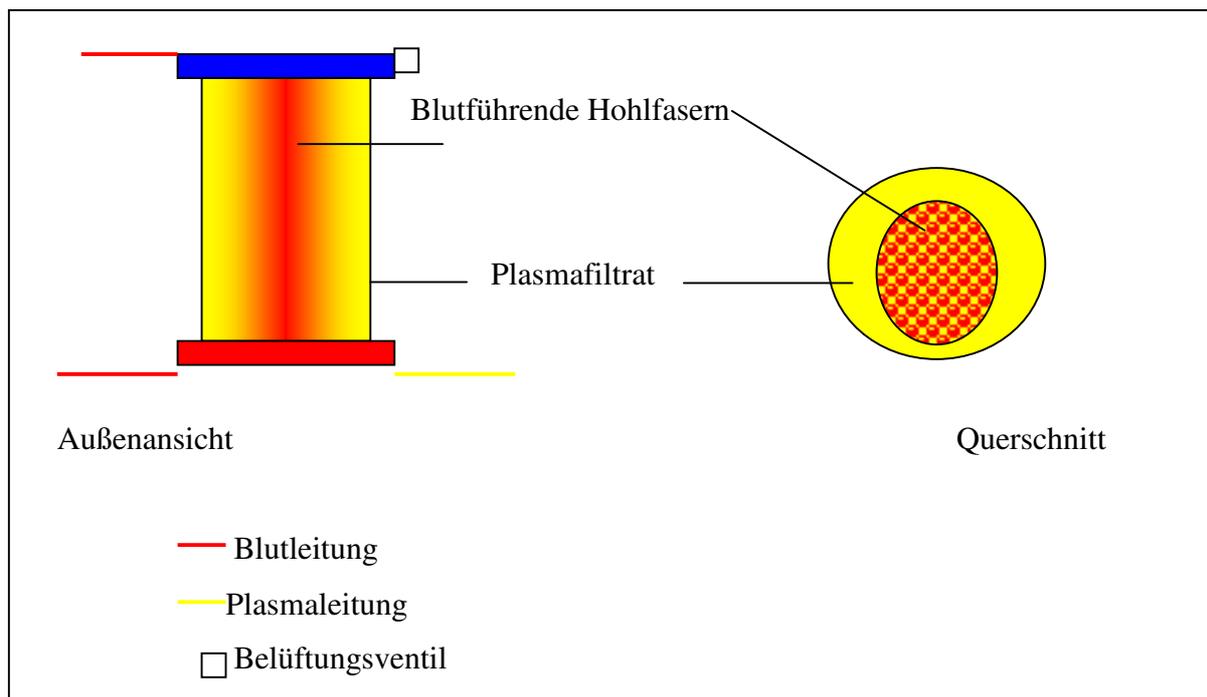


Abbildung 6: Hollow Fiber Filter

Die Hohlfasern bestehen aus asymmetrisch angeordneten Membranen. Zur blutführenden Seite hin ist die Membran $1\mu\text{m}$ breit und hat einen Porendurchmesser von $0,2$ bis $0,5\mu\text{m}$. Bei dieser Porengröße kommt es zu einem hohem Filtratstrom, ohne eine Hämolyse zu begünstigen. Es

schließt sich eine 140-160 µm kräftige Membranschicht an, deren Porendurchmesser sich nach Außen erweitern. Die Membranen lassen molekulare Substanzen bis zu einer Molmasse von 0,2 bis $0,5 \times 10^6$ Dalton passieren. Sie bestehen in der Regel aus hydrophoben Polymeren und zeichnen sich durch eine gleichmäßig gute Filtratleistung und Biokompatibilität aus (49, 50).

Die Hämodialyse wird therapeutisch eingesetzt, um die Nierenfunktion zeitweise zu übernehmen. Dabei wird das Blut über einen extrakorporalen Kreislauf durch den Membranseparator geleitet, welcher die Reinigung des Blutes von urämischen Stoffwechselmetaboliten und die Regulation des Wasser- und Säure- Basen-Haushalts übernimmt. Der Stofftransport findet durch die Transportmechanismen der Diffusion und Konvektion über die semipermeable Membran statt. Bei Diffusion bewegen sich die Stoffe entsprechend der Konzentrationsdifferenz von der Lösung mit der höheren Konzentration zu der mit der niedrigeren Konzentration. Dies ist ein passiver Vorgang (51, 52), der von dem Konzentrationsgradienten, der Masse der Moleküle, dem Diffusionsweg, der Temperatur und der Strömung im System beeinflusst wird. Die Konvektion ist der Transport von gelösten Substanzen zusammen mit filtrierter Flüssigkeit. Sie ist abhängig von dem hydrostatischen Druckgefälle und wird nicht so sehr wie bei der Diffusion von dem Verhältnis der Größe der Moleküle zu der Porengröße bestimmt.

Die Gewinnung des Filtrats bei der Membranplasmapherese lässt sich durch den Begriff der „cross flow filtration“ beschreiben (s. Abb. 7). Die gelösten bzw. ungelösten Stoffe fließen parallel zur Filtermembran und können diese nicht passieren. Das Filtrat wird dabei senkrecht zur Filtermembran durch den Suspensions- bzw. Lösungsfluss transportiert (53).

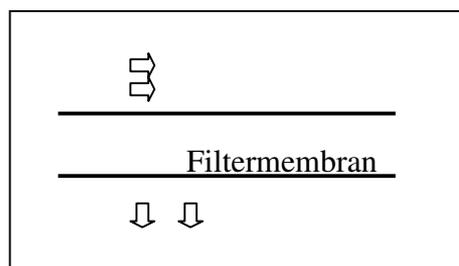


Abbildung 7: Cross – flow- filtration

B.1.2 Nutzung des Hollow Fiber Filters für die Blutkomponentenherstellung

Die für die Hämodialyse eingesetzten Hollow Fiber Filter trennen die nicht benötigten, flüssigen Bestandteile von den zellulären Bestandteilen des Blutes. Um dies zu gewährleisten haben die Membranen der Hohlfasern eine Porengröße von 0,2-0,5 µm. Da die Erythrozyten eine Größe von 4-7 µm haben, werden sie durch den Filter zurückgehalten und somit vom Plasma getrennt. In der hier vorgestellten Arbeit, wurde unter diesen Voraussetzungen der für die Hämodialyse verwendete Hollow Fiber Filter ohne Modifizierung für die Herstellung von Blutkomponenten genutzt.

Für die Versuche wurde der Hollow Fiber Filter: „Hemaplex BT 900 C“ der Firma Dideco (Italien) verwendet (s. Abb.8).

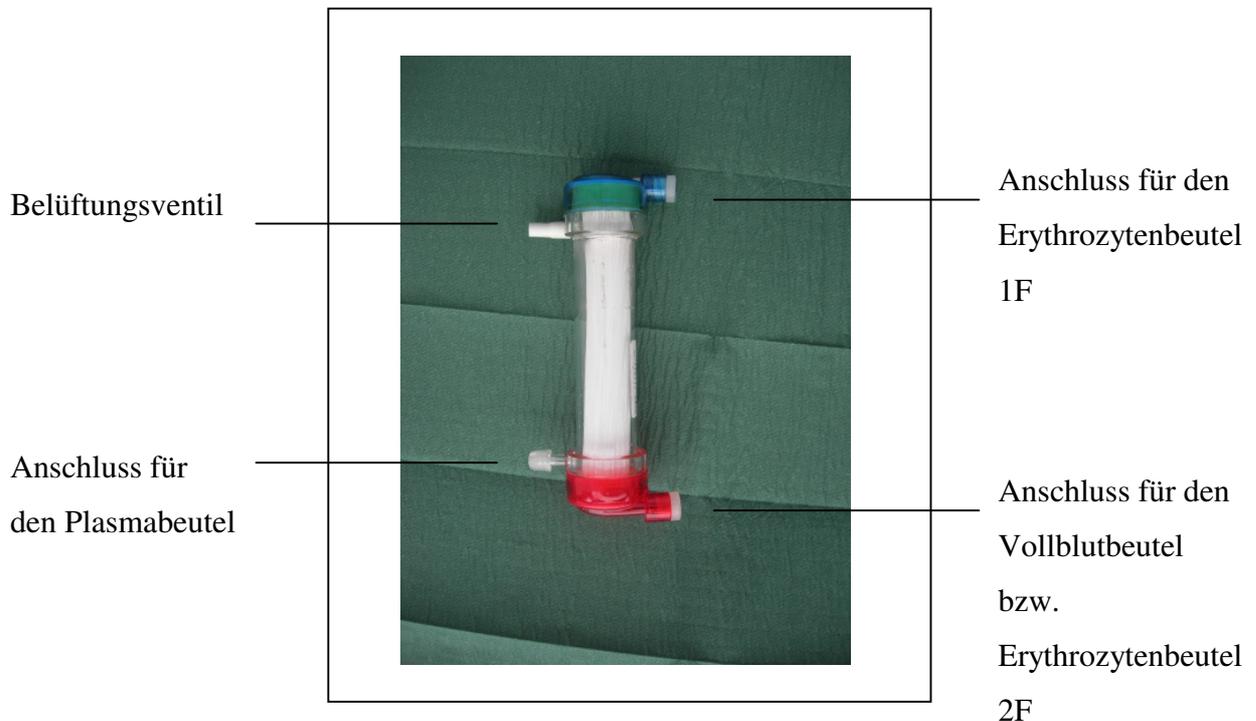


Abbildung 8: Hollow Fiber Filter (Hemaplex BT 900 C)

Dieser entspricht einem, für die Routine in der Hämodialyse gebräuchlichem Filter, der sich durch die folgenden Merkmale beschreiben lässt. (s. Tab. 2)

Tabelle 2: Hollow Fiber Filter (Hemaplex BT 900 C)

Hersteller	Dideco
Bezeichnung	Hemaplex BT 900 C
Hohlfaser-Material	Polypropylen
Länge des HF Filters	16 cm
Effektive Länge	14 cm
Porengröße	0,2-0,5 µm
Wandstärke	150 µm
Innendurchmesser	330 µm
Oberfläche	0,1 m ²

B.1.3 Vollblutkonserven

Die für die Versuche benötigten Vollblutkonserven entstammten gesunden Spendern, die jeweils aufgeklärt wurden und ihre Einwilligung gegeben hatten. Bis zur Gewinnung der Vollblutkonserven entsprach das Vorgehen hinsichtlich der Spenderauswahl und der Blutentnahme dem Ablauf für die Blutkomponentenherstellung mit Hilfe der Zentrifuge.

B.1.4 Stabilisatorlösung und additive Lösung

Für die Versuche wurden Teile der Vierfachbeutelsysteme, sowohl der Firma Maco Pharma, als auch der Firma Fresenius verwendet. Die Vollblutbeutel waren von Fresenius und enthielten 70 ml CPD Stabilisatorlösung (2,63 g Natriumcitrat-Dihydrat, 327 mg Citronensäure, 2,55 g Glucose, 251 mg Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat). Das darin enthaltene Citrat wirkt antikoagulierend, das Phosphat wirkt dem absinkenden PH-Wert durch die anaerobe Glykolyse in den Erythrozyten entgegen und die Dextrose dient der Energiebereitstellung.

Nach Herstellung des Erythrozytenkonzentrats, wurde diesem die additive Lösung beigegeben. Die darin enthaltenen Purinbasen (Adenin, Guanosin) unterstützten die Synthese von ATP und 2,3-Diphosphoglycerat und wirkten so günstig auf die Lebensfähigkeit der Erythrozyten ein. Mannitol bewirkte eine zusätzliche Membranstabilisation.

Die den Erythrozytenkonzentratbeuteln zugesetzten additiven Lösungen enthielten für die Firma Maco Pharma 110ml SAG-M und für die Firma Fresenius 110ml PAGGS-M (s. Tab. 3).

Tabelle 3: Inhaltsstoffe der additiven Lösungen

Inhaltsstoff	SAG-M	PAGGS-M
Natriumchlorid	877 mg	421 mg
Glucosemonohydrat	900 mg	940 mg
Adenin	16,9 mg	19,4 mg
Guanosin		40,8 mg
Mannitol	525 mg	1000 mg
Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat		143,2 mg
Natriumdihydrogenphosphatdihydrat		125,5 mg
Wasser	ad 100 ml	ad 100 ml

Die Konservierungslösungen ermöglichen eine Verlängerung der Überlebenszeit an funktionstüchtigen Erythrozyten, so dass die Erythrozyten bei einer Lagerungstemperatur von + 4°C +/-2°C bis zu 35 Tage (SAG-M) bzw. 49 Tage (PAGGS-M) haltbar sind.

B.1.5 Leukozytenfilter

Leukozyten können, wenn sie in dem zu transfundierendem Blut enthalten sind, eine Reihe von negativen Reaktionen im Empfänger auslösen. So kann es zu Leukozyten vermittelten Fieberreaktionen (FNHTR: febrile nicht-hämolytische Transfusionsreaktionen), HLA-Alloimmunisierung, Immunsuppression und der Übertragung zellständiger Viren (CMV, HHV8, HTLV) kommen. Es konnte belegt werden, dass die Leukozytenfiltration vor der Transfusion von Blutprodukten das Auftreten von Nebenwirkungen stark reduziert. So wurde mit der Begründung auf dem §28 Abs. 3c Nr.1 und 2 des Arzneimittelgesetzes in einem Bescheid des Paul Ehrlich Instituts festgelegt, dass nur Vollblute, Erythrozytenkonzentrate und Thrombozytenkonzentrate verabreicht werden dürfen, deren Leukozytengehalt unter 1×10^6 pro Einheit / Blutkonserve beträgt.

Die Entfernung der Leukozyten aus dem Blut gelingt, neben den Möglichkeiten der Zentrifugation und Sedimentation, am besten durch die Filtration. Die verwendeten Filter

bestehen aus mehreren Schichten Polyesterfasern, deren Benetzungsfähigkeit durch Ionisation und chemische Vorbehandlung erhöht wurde. Der Filtrationsvorgang erfolgt durch direkte Adhäsion der Leukozyten an den Fasern oder über Thrombozyten an die die Leukozyten adhärnt sind und den mechanischen Siebeffekt. Eine hinreichende Leukozytenfiltration findet durch ein einmaliges Passieren des Blutes durch den Filter statt, welcher ein Bestandteil des geschlossenen Beutelsystems ist. Die Leukozytendepletion ist prinzipiell vor oder nach der Zentrifugation möglich und schließt sich auch an die Apherese an. Sie sollte jedoch 6 bis 24 Stunden nach der Blutentnahme bei Raumtemperatur erfolgen.

Bei mehreren Versuchen wurde die Leukozytenfiltration als Teil des Versuchsablaufs durchgeführt. Dafür wurde der Filter „Leucoflex“ der Firma Maco Pharma verwendet (s. Abb.9).



Abbildung 9: Leukozytenfilter (Maco Pharma)

B.1.6 Materialauflistung

- Vollblutkonserven (Fresenius)
- Leukozytenfilter (Maco Pharma)
- Hollow Fiber Filter (Hemaplex BT 900 Dideco)
- Erythrozytenbeutel 1F und 2F (Maco Pharma, Fresenius)
- Beutel mit 110 ml additiver Lösung (Maco Pharma, Fresenius)
- Plasmabeutel (Maco Pharma, Fresenius)
- Sterile Schlauchverbindungen (Maco Pharma, Fresenius)
- Infusionsständer als Aufhängung
- Plastikklemmen
- Waage (Sartorius universale)
- Thermometer
- Steriles Schweißgerät (Terumo Sterile Tubing Welder (TS CD))
- Blutanalysator (Sysmex K-4500)

B.2 Versuchsdurchführung

Für die Durchführung der Versuche wurde eine Apparatur konstruiert, die sich aus dem Hollow Fiber Filter und Bestandteilen des geschlossenen Beutelsystems zusammensetzte. Die für die Versuche benötigten Beutel und Schlauchverbindungen wurden aus dem System abgetrennt und in neuer Anordnung unter sterilen Bedingungen mit dem Schweißgerät der Firma Terumo zusammengeschweißt. Als Aufhängevorrichtung diente ein höhenverstellbarer Infusionsständer, an dessen ausziehbaren Teil der Stange der Hollow Fiber Filter (abgekürzt mit HF Filter) befestigt wurde. Das grundsätzliche Prinzip des Versuchsaufbaus wird an einer der möglichen Varianten vorgestellt (s. Abb. 10-12).

An den mit Spenderblut gefüllten Vollblutkonservenbeutel (a) wurde der Leukozytenfilter (b) geschweißt (s. Abb.10 S.20). Bei einigen Versuchen wurde der Leukozytenfilter an anderer Position der Apparatur angebracht oder die Integration des Leukozytenfilters entfiel, wenn die Leukozytendepletion innerhalb des Versuchsablaufs nicht vorgesehen war. Das untere Ende des Leukozytenfilters (b) wurde mit einem leeren Beutel (c) verbunden, der als Erythrozytenbeutel 2F (2F = 2.Filtration) bezeichnet wurde. Dieser Beutel (c) wurde über einen Verbindungsschlauch mit dem unteren roten Zulaufventil (d) an den HF Filter angeschlossen.

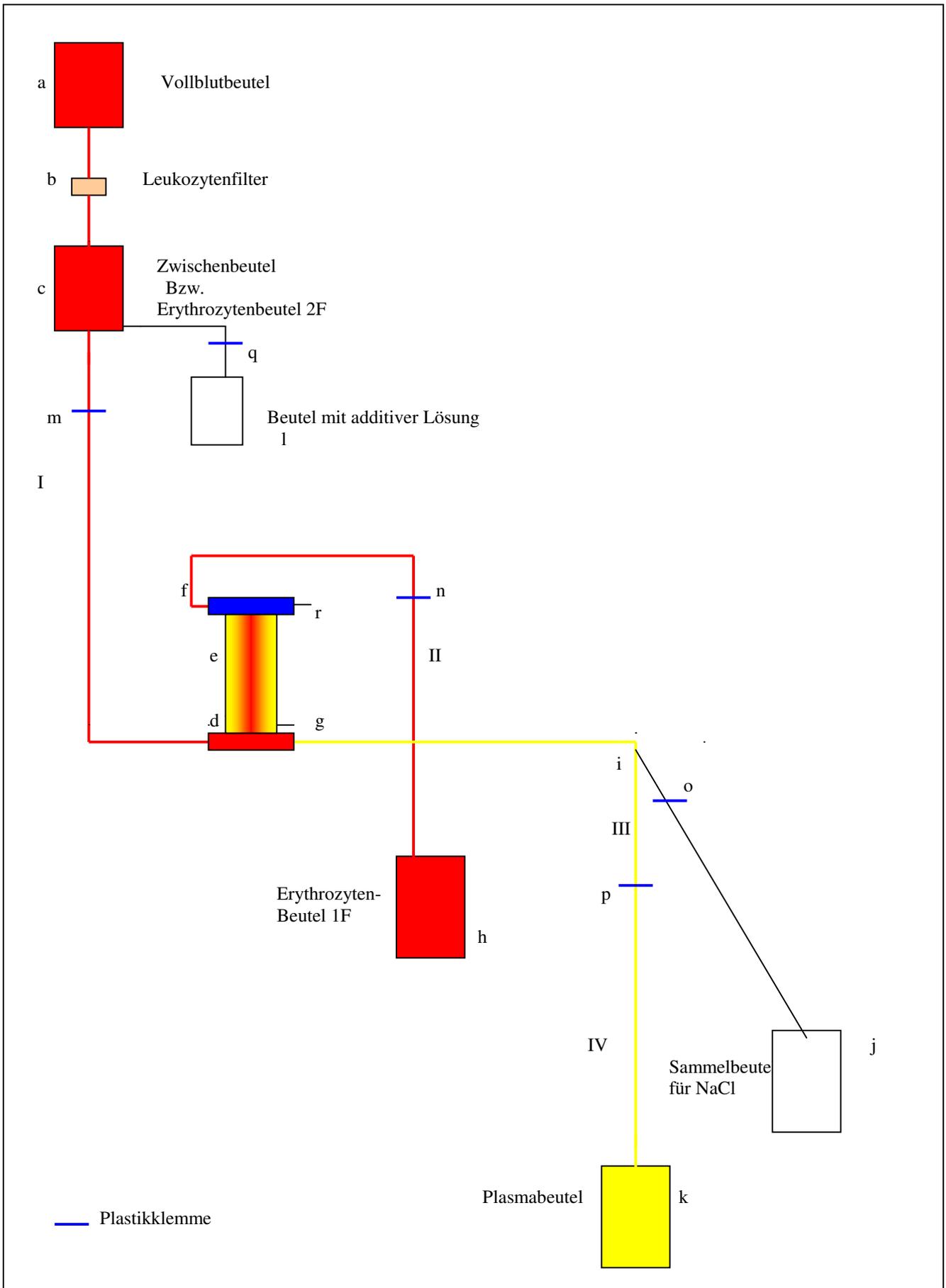


Abbildung 10: Detaillierte schematische Darstellung der 1. Filtration, bei der die Leukozyten-depletion vor der HF-Filtration erfolgt

Die Vollblutkonserve mit daran angeschlossenen Leukozytenfilter und Erythrozytenbeutel 2F wurde über dem HF Filter an dem Infusionsständer befestigt. Das obere blaue Ventil (f) des HF Filters wurde mit dem leeren Beutel 1F (1F = 1.Filtration) (h) verbunden und dieser unterhalb des HF Filters an dem Infusionsständer angebracht. Zusätzlich der beiden Ventile (d, f) die den Ein- und Abfluss des Blutes durch die Hohlfasern des HF Filters ermöglichen, befindet sich ein weiteres Ventil (g) am HF Filter. Dieses Ventil (g) ist ein Anschluss zur Filtratseite des HF Filters. An dieses Ventil wurde ein leerer Beutel (k) zum Sammeln des Plasmas angeschlossen und über eine abzweigende Schlauchverbindung (i) ein leerer Beutel (j) zum Sammeln des in dem HF Filter enthaltenen Kochsalzlösung angebracht. Beide Beutel wurden unterhalb des HF Filters am Infusionsständer befestigt.

Die Abstände der einzelnen Beutel von dem HF Filter sind für die Versuche variiert worden und im Kapitel Ergebnisse (s. Tab. 8-10 S.36-38) aufgeführt.

Vor Versuchsbeginn wurden die Vollblutkonserven mit einer Laborwaage gewogen und ihre Temperatur mit einem Ohr- Thermometer bestimmt. Es wurde eine Blutprobe aus einem der abgeschweißten Schlauchsegmente des Vollblutbeutels genommen und der Hämatokrit der Konserve durch einen „Blutanalysator“ gemessen. Die benötigten Beutel wurden in den für die jeweiligen Versuche gewählten Abständen an dem Infusionsständer angebracht und an den HF Filter angeschlossen. Die Verbindungsschläuche I - IV waren über Plastikklemmen (m-p) blockiert. Zu Beginn des Versuchs wurde der Verschlussmechanismus der Vollblutkonserve geöffnet und die für die erste Filtration benötigte Zeit mit einer Stoppuhr gemessen. Bei einem Teil der Versuche lief das Blut zunächst durch den Leukozytenfilter in den Erythrozytenbeutel 2F. Nachdem dieser gefüllt war, wurde der Verschlussmechanismus geöffnet und die Klemme der Verbindung (m) gelöst. Entfiel dieser Schritt floss das Blut direkt von der Vollblutkonserve zum HF Filter (e) .

Über das untere Ventil (d) floss das Blut durch die Hohlfasern und wurde durch den Druck des nachkommenden Blutes in Richtung oberes Ventil (f) befördert. Während dieses Vorgangs diffundierte das Plasma über die semipermeable Membran auf die Filtratseite des HF Filters. Die in dem HF Filter zur Benetzung der Hohlfasern enthaltene Kochsalzlösung wurde durch das gefilterte Plasma, nach Lösen der Klemme (o) der Verbindung III, in den leeren Beutel (j) verdrängt. Diese Maßnahme wirkte einer Verdünnung des gesammelten Plasmas entgegen. Die Klemme (o) wurde verschlossen, nachdem die Kochsalzlösung aus dem HF Filter abgeflossen war und das Plasma in der Verbindung III sichtbar wurde. Nun wurde die Klemme (p) der Verbindung IV gelöst und zum parallelen Sammeln des Plasmas während des gesamten Filtrationsvorgangs offengehalten. Die 1. Filtration war beendet, nachdem das komplette Blut

durch den HF Filter geflossen und vollständig im Erythrozytenbeutel 1F aufgefangen worden war.

Da die Bestimmung des Hämatokrits des Erythrozytenkonzentrates nach der ersten Filtration einen niedrigen Wert ergab, wurde eine zweite Filtration durchgeführt. Für die 2. Filtration wurden nur die Positionen der Erythrozytenbeutel 1F und 2F verändert (s. Abb. 11).

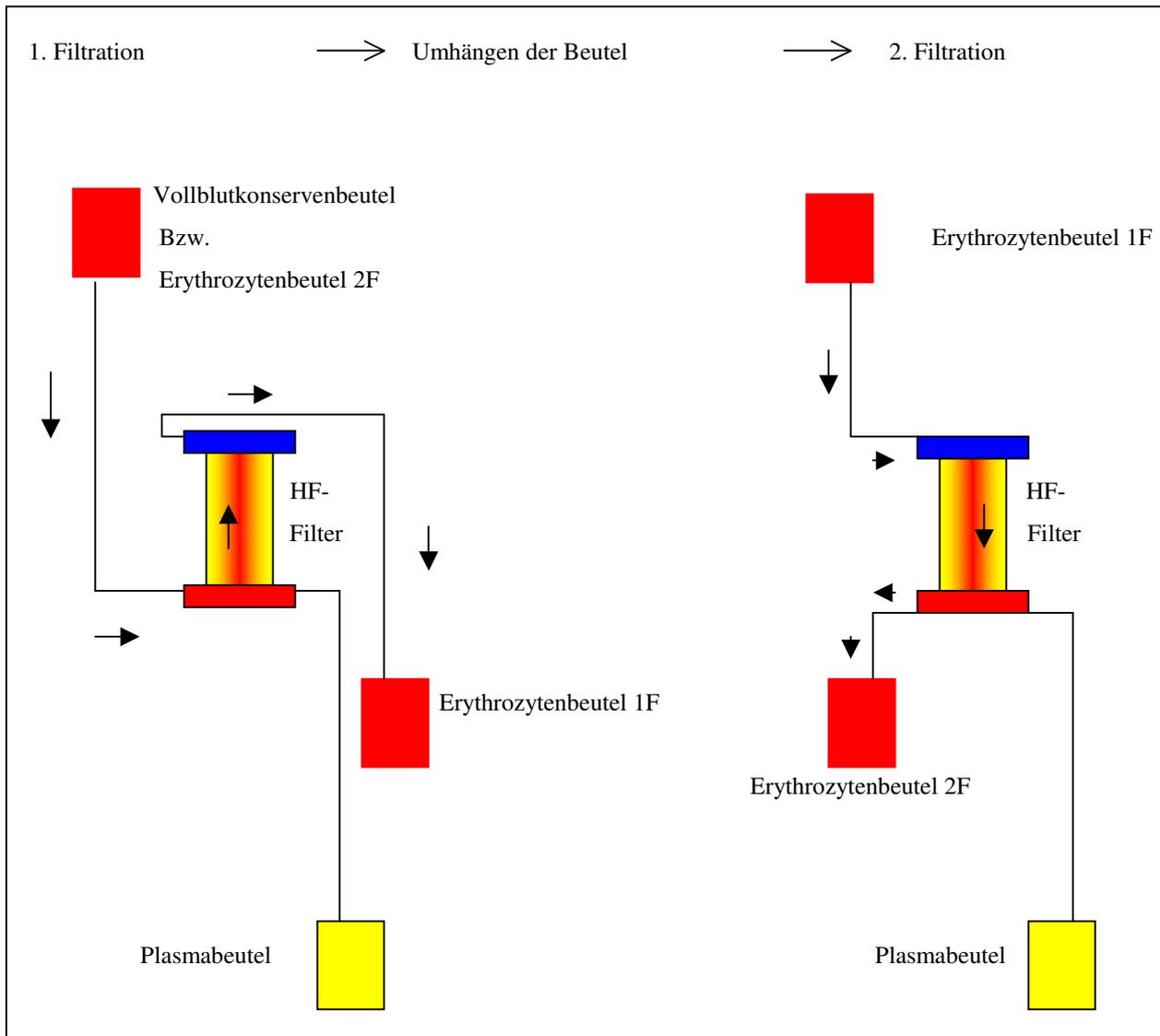


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Blutflusses durch den HF Filter in der Reihenfolge der Filterungen

Der mit Erythrozytenkonzentrat gefüllte Erythrozytenbeutel 1F wurde über dem HF Filter angebracht und der leere Erythrozytenbeutel 2F unter dem HF Filter befestigt (s. Abb. 12 S.23). Die gewählten Abstände variierten mit den jeweiligen Versuchen.

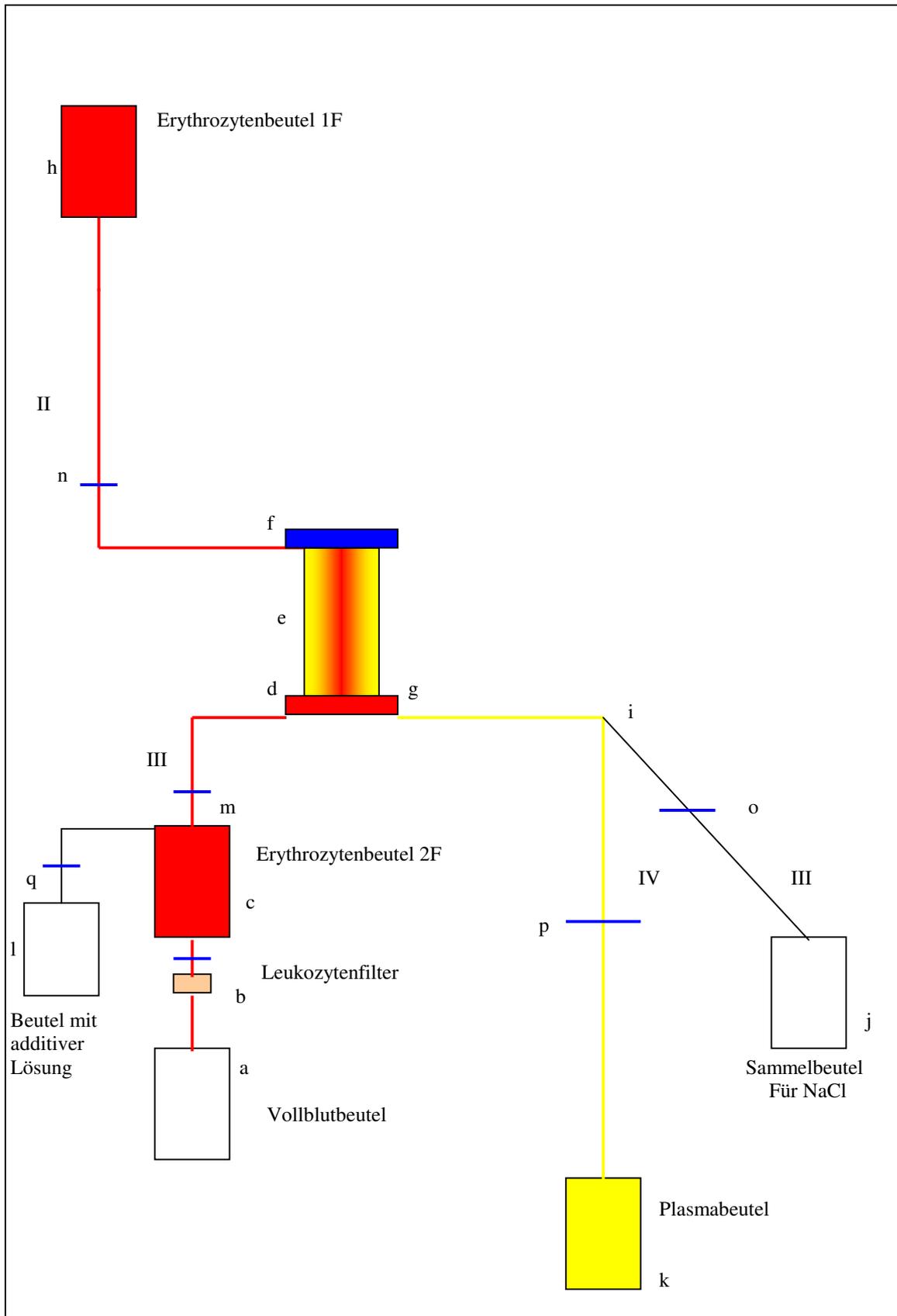


Abbildung 12: Detaillierte schematische Darstellung der 2. Filtration

Mit dem Lösen der Klemme (n) der Verbindung II vor dem Erythrozytenbeutel 1F diffundierte das Blut nun in umgekehrter Richtung durch den HF Filter. Das Ende der 2. Filtration war mit der vollständigen Sammlung des Erythrozytenkonzentrats im Erythrozytenbeutel 2F erreicht. Nach dem Ablesen der Zeit für den zweiten Filtrationsvorgang, wurde der gefüllte Erythrozytenbeutel 2F gewogen.

Anschließend wurde der Hämatokrit des erhaltenen Erythrozytenkonzentrats bestimmt und die additive Lösung zugegeben. Danach wurde der Hämatokrit erneut gemessen.

Das sich noch in dem HF Filter befindliche Plasma wurde durch Belüftung (r) in den Plasmabeutel abgelassen. Für die klinische Anwendung dieses Verfahrens zur Gewährleistung der Sterilität, müsste der HF Filter jedoch mit einem anderen Belüftungsventil versehen werden.

C. Ergebnisse

C.1 Optimierungsversuche ohne Leukozytenfilter

C.1.1 Auswirkungen mehrmaligen Filtrierens auf den Hämatokrit

In den ersten beiden Versuchen wurde der grundsätzliche Versuchsaufbau für das Gelingen der Filtration über den HF Filter experimentell ermittelt. Das Vollblut wurde über den HF Filter filtriert und das erhaltene Erythrozytenkonzentrat im Beutel 1F gesammelt (s. Abb. 10 S. 20). Laut der „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten“ müssen die Erythrozytenkonzentrate nach der Zugabe von additiver Lösung einen Hämatokrit von 50%-70% erreichen (s. Tab. 1 S.12). Der nach der ersten Filtration gemessene Hämatokrit ergab für den zweiten Versuch einen Wert von 56% (ohne Additiv) und würde nach der Zugabe von additiver Lösung unter einen Hämatokrit von 50% sinken. Um einen höheren Hämatokritwert zu erreichen, wurde das Erythrozytenkonzentrat ein zweites Mal filtriert (s. Abb. 12 S.23). Der im Anschluss gemessene Hämatokrit hatte einem Wert von 68,5% (ohne Additiv) (s. Tab. 8 S.36).

Nach zweimaliger Filtration wurde das Blut ein drittes mal über denselben HF Filter filtriert (Versuch 3). Der gemessene Hämatokrit lag mit 73,6% auch deutlich über dem Vorwert. Die sich im nächsten Versuch (Versuch 4) anschließende viermalige Filtration erbrachte keine zusätzliche Steigerung des Hämatokritwertes. Es folgten weitere Versuche mit zweimaligem Filtrieren. Durch die Optimierung des Versuchsaufbaus konnten so ebenfalls ausreichend hohe Hämatokritwerte erreicht werden, so dass der Versuchsablauf auf zwei Filtrationen über den HF Filter beschränkt wurde.

C.1.2 Findung der optimalen Abstandsverhältnisse innerhalb der Apparatur

Nachdem durch die ersten Versuche der wesentliche Aufbau bzw. Ablauf gefunden war, sollten durch weitere Versuche die Ergebnisse optimiert werden. Es wurden die Auswirkungen verschiedener Abstände der Blutbeutel zum HF Filter auf die benötigte Laufzeit und den Hämatokritwert untersucht.

Zunächst wurden die Abstände der Vollblutkonserve zum HF Filter für die erste Filtration variiert (s. Tab. 4 S.26). Beginnend mit einem geringen Abstand von 9 cm des Vollblutbeutels zum HF Filter (Versuch 5) wurde der erste Filtrationsdurchgang gestartet. Um die Laufzeit zu verringern wurden die Abstände der Vollblutkonserve zum HF Filter in den sich anschließenden Versuchen stetig gesteigert.

*Tabelle 4: Ergebnisse der Versuche ohne Leukozytenfilter
nach der 1. Filtration*

Versuche	Abstand: Vollblut/HF Filter	Hämatokrit ohne additive Lösung	Laufzeit
5	9 cm	49,9 %	28 min
6	20 cm	59,3 %	25 min
7	20 cm	-	31 min
8	25 cm	47,0 %	-
9	30 cm	49,6 %	12 min
10	30 cm	37,9 %	14 min
11	40 cm	54,6 %	10 min
12	40 cm	55,6 %	23 min
13	40 cm	53,9 %	15 min
14	40 cm	51,8 %	-

Es wurde deutlich, dass die Laufzeit der ersten Filtration sich stark verkürzte, wenn der Abstand des Vollblutbeutels zum HF Filter 30 cm betrug. Durch die Erhöhung des Abstandes auf 30 bzw. 40 cm konnte die Laufzeit mit einem Durchschnittswert von 14,8 Minuten um beinahe die Hälfte verkürzt werden. Durch die schnellere Passage des Blutes über den HF Filter kam es zu einer Verminderung der Hämatokritwerte von durchschnittlich 4 %.

Für die zweite Filtration wurde der Beutel 1F in geringen Entfernungen von 9 cm und 20 cm (Versuche 5, 8, 6) zum HF Filter angebracht (s. Tab. 5 S.27). Die ermittelte Laufzeit für die zweite Filtration betrug 40 Minuten.

In den Versuchen 7 und 9 bis 14 wurde der Abstand des Beutels 1F zum HF Filter für die zweite Filtration auf 40 cm erhöht. Bei einem Abstand von 40 cm war die zweite Filtration bei vier der Versuche unter 20 Minuten und bei zwei weiteren Versuchen nach über bzw. 40 Minuten beendet. Wie sich schon an den Ergebnissen der Entfernung des Vollblutbeutels von dem HF Filter für die erste Filtration herausstellte, zeigte auch der Abstand des Beutels 1F von dem HF Filter während der zweiten Filtration Einfluss auf die für den Filtrationsdurchgang benötigte Laufzeit. Die Anbringung des mit Blut gefüllten Beutels über dem HF Filter in einem Abstand von 40 cm, bewirkte bei der zweiten Filtration in vier von sechs Versuchen eine Halbierung der Laufzeit im Vergleich zu der Befestigung des Beutels bei 9 bis 20 cm.

Die durchgeführten Versuche erbrachten bei einem Mittelwert von 64,4% relativ konstante Hämatokritwerte. Die durch die ersten Filtrationen erreichten Hämatokritwerte wurden durch die zweiten Filtrationen um einen Zugewinn an Hämatokrit von durchschnittlich 13,3% erhöht. Die noch als kritisch zu beurteilenden Hämatokritwerte, konnten in den folgenden Versuchen noch gesteigert werden.

*Tabelle 5: Ergebnisse der Versuche ohne Leukozytenfilter nach der 2. Filtration **

Versuche	Abstand Erybeutel 1F/ HF Filter	Ausgangs- Hämatokrit	Hämatokrit ohne additive Lösung	Laufzeit 2.Filtration	Gesamtlaufzeit
5	9cm	34,4%	67,2%	40min	68min
6	20cm	30,0%	69,1%	40min	65min
7	40cm	37,3%	64,5%	51min	82min
8	9cm	33,8%	62,8%	-	55min
9	40cm	32,3%	63,4%	17min	29min
10	40cm	33,0%	57,8%	18min	32min
11	40cm	37,7%	67,4%	15min	25min
12	40cm	36,6%	70,5%	40min	63min
13	40cm	36,7%	54,0%	20min	35min
14	40cm	35,2%	67,1%	-	24min

* Anmerkung: Bei Unterschieden in den Ergebnissen bei gleichem Versuchsaufbau bleibt der Ausgangshämatokrit zu berücksichtigen, welcher jedoch nicht immer mit dem Hämatokrit nach der zweiten Filtration korreliert.

C.1.3 Bestimmung einzuhaltender Abstände zur Vermeidung einer Hämolyse

Im folgenden Versuch (Versuch 15) wurde der Beutel 1F für die zweite Filtration auf eine Höhe von 125 cm gehängt, um die Laufzeit weiter zu beschleunigen. Während dieser Filtration kam es jedoch zu einer leichten Hämolyse. Der nächste Versuch (Versuch 16) sollte den maximal möglichen Abstand der Blutbeutel zum HF Filter festlegen, bei welchem es nicht zu einer Hämolyse kam. Ausgehend von dem bereits erfolgreich getesteten Abstand von 40 cm, wurde der Vollblutbeutel diesmal in 50 cm Entfernung von dem HF Filter angebracht und das Blut einmal filtrierte. Bei der zweiten Filtration befand sich der Beutel 1F ebenfalls in einem Abstand

von 50 cm zum HF Filter. Jetzt zeigte sich jedoch eine Hämolyse im Plasmabeutel. Durch Tieferhängen des Beutels 1F auf 40 cm konnte die Hämolyse wieder verhindert und die zweite Filtration störungsfrei fortgesetzt werden. Während der ersten Filtration war es auch bei Abständen von 80 cm bzw. 100 cm der Vollblutkonserve zum HF Filter in der gesamten Versuchsreihe nicht zu einer Hämolyse gekommen.

C.2 Optimierungsversuche mit Leukozytenfilter

C.2.1 Leukozytenfiltration vor Versuchsbeginn

In dem folgenden Versuch (Versuch 17) wurde die Leukozytenfiltration der Vollblutkonserve über den Leukozytenfilter außerhalb des Versuchsaufbaus durchgeführt, bevor der Versuch gestartet wurde. Der Hämatokrit unterschied sich mit 67,1% nicht von den Versuchen ohne Leukozytenfiltration.

Für die weiteren Versuche wurde der Leukozytenfilter an unterschiedlichen Standorten in den Versuchsaufbau integriert:

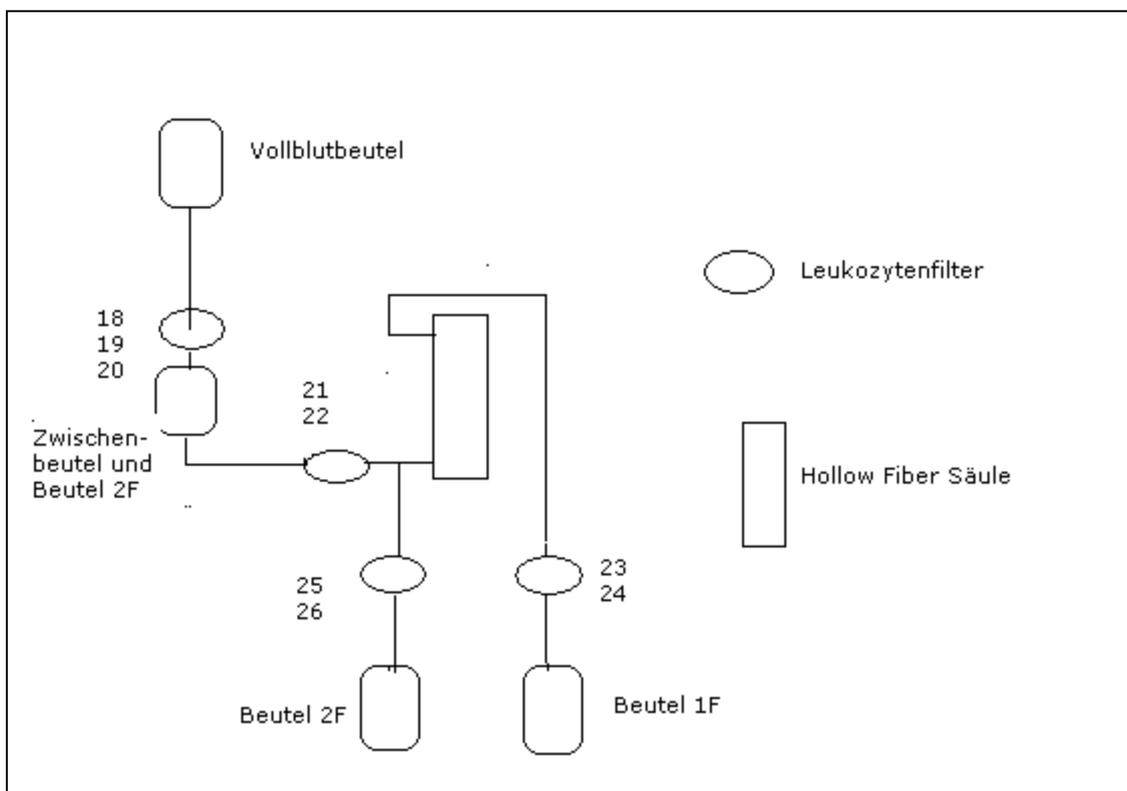


Abbildung 13: Positionen des Leukozytenfilters der Versuche 18 bis 26

C.2.2 Durchführung der Leukozytenfiltration vor der ersten Hollow Fiber Filtration

Der Leukozytenfilter wurde zunächst (Versuche 18, 19 und 20) nach der Vollblutkonserve positioniert, so wie er auch normalerweise für die Leukozytendepletion nach der Blutentnahme der Konserven innerhalb des Beutelsystems angebracht ist. Nach dem Leukozytenfilter wurde ein leerer Beutel zum vorläufigen Sammeln des Blutes integriert, dieser entsprach während der zweiten Filtration dem mit 2F bezeichneten Beutel (s. Abb. 13). Der Vollblutkonservenbeutel mit dem Leukozytenfilter wurde in einer Entfernung von 100 cm zum HF Filter angebracht und der daran angeschlossene leere Beutel befand sich in dem bewährten Abstand von 40 cm zum HF Filter (Versuch 18). Durch die Erhöhung des Abstandes der Vollblutkonserve wurde ein ausreichender Druck für den Blutfluss zum Passieren des Leukozytenfilters erreicht. Der Beutel 1F wurde für die zweite Filtration bei einer Höhe von 40 cm angebracht. So konnte ein Hämatokritwert von 72,7% erzielt werden. Eine geringere Entfernung der Vollblutkonserve von dem HF Filter von 80 cm (Versuch 19) und des Beutels 1F für die zweite Filtration von 40 cm, erbrachte einen Hämatokritwert von 73,8%.

Leukozytenfiltration mit umgebender Metallkammer:

Der nächste Versuch (Versuch 20) entsprach in Aufbau und Abständen dem vorherigen Versuch (Versuch 19) (s. Abb. 13). Zusätzlich wurde aber eine Metallkammer (s. Abb. 14) um den Leukozytenfilter angebracht, um den Durchfluss zu beschleunigen, was sich aber mit einer Gesamtlaufzeit von 75 Minuten nicht bestätigte.

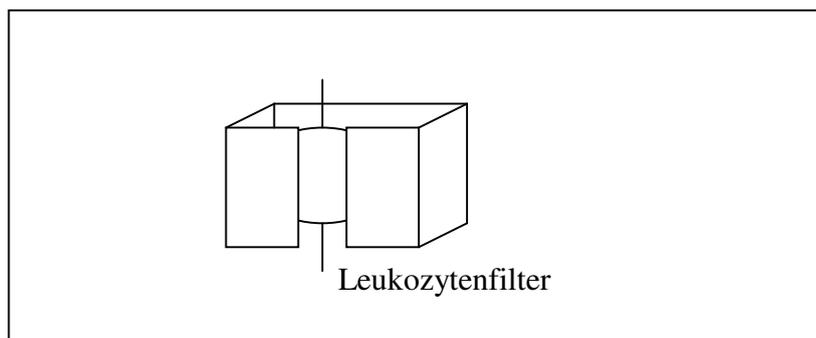


Abbildung 14: Skizze von Metallgehäuse mit Leukozytenfilter

Der Leukozytenfilter wurde in den folgenden beiden Versuchen (Versuch 21 und 22) ebenfalls nach der Vollblutkonserve vor dem HF Filter angebracht. In diesem Fall entfiel der Beutel zum vorläufigen Sammeln des leukozytenfiltrierten Blutes. Die Vollblutbeutel wurden 90 cm bzw. 80 cm vor dem HF Filter befestigt. Da es bei dieser Konstruktion zu keinem Durchfluss des

Blutes über den HF Filter kam und somit auch die Filtration ausblieb, mussten die Versuche abgebrochen werden.

C.2.3 Durchführung der Leukozytenfiltration nach der ersten Hollow Fiber Filtration

Für diesen Versuch (Versuch 23) wurde der Leukozytenfilter vor dem Beutel 1F befestigt, so dass die Leukozytendepletion sich an die erste HF- Filtration anschloss (s. Abb. 13). Die Hämatokritbestimmung des Beutels 1F ergab nach der ersten Filtration einen Wert von 29,2 %. Es wurde ein zweiter Versuch (Versuch 24) mit dem gleichen Versuchsaufbau durchgeführt, bei welchem lediglich der Abstand der Vollblutkonserve von dem HF Filter verdoppelt wurde (s. Tab. 10 S.38), um die Laufzeit zu beschleunigen. Nach der ersten Filtration wurde ein Hämatokrit von 33,3 % ermittelt. Die bestimmten Hämatokritwerte der beiden Versuche waren niedriger als ihre Ausgangswerte.

C.2.4 Durchführung der Leukozytenfiltration nach der zweiten Hollow Fiber Filtration

Der Leukozytenfilter wurde vor dem Beutel 2F unterhalb des HF Filters angebracht, so dass die Leukozytendepletion nach der zweiten HF- Filtration erfolgte (s. Abb.13). Die Abstände wurden mit 40 cm für die Vollblutkonserve und 40 cm für den Beutel 1F in den Versuchen 25 und 26 jeweils gleich gewählt. Es wurden mit Hämatokritwerten von 72,4% bzw. 72,1% gute Ergebnisse erzielt. Auch die Laufzeiten waren mit 48 bzw. 41 Minuten für diese beiden Versuche relativ kurz und akzeptabel.

C.2.5 Optimale Positionen für den Leukozytenfilter innerhalb der Apparatur

Die Varianten der Anbringung des Leukozytenfilters nach der Vollblutkonserve mit Zwischenbeutel, sowie vor dem Beutel 2F, erreichten mit Hämatokritwerten von ca. 72% ein gleichwertig gutes Ergebnis. Die Gesamtlaufzeit für die beiden Filtrationsdurchgänge über den HF Filter war für die Leukozytenfiltration nach der zweiten HF-Filtration (Versuche 25 und 26) mit durchschnittlich ca. 45 Minuten jedoch fast doppelt so schnell wie die der Leukozytenfiltration (Versuche 18, 19 und 20) vor der ersten HF-Filtration (s. Tab. 6 S.31).

Tabelle 6: Ergebnisse der Versuche mit Leukozytenfilter

Versuch	Position des Leukozytenfilters	Hämatokrit ohne additive Lösung	Gesamtlaufzeit
18	Nach der Vollblutkonserve	72,7 %	-
19	Nach der Vollblutkonserve	73,8 %	85 min
20	Nach der Vollblutkonserve +Metallkammer	68,2 %	75 min
21	Unmittelbar vor dem HF Filter	Abbruch	-
22	Unmittelbar vor dem HF Filter	Abbruch	-
23	Nach der 1. Filtration	Abbruch	-
24	Nach der 1. Filtration	Abbruch	-
25	Nach der 2. Filtration	72,4 %	48 min
26	Nach der 2. Filtration	72,1 %	41 min

C.2.6 Auswirkung der Flussrichtung des Blutes durch den HF Filter auf die Hämatokritwerte

Da das Blut für die 1. Filtration den HF Filter von unten nach oben und für die 2. Filtration den HF Filter entgegengesetzt passierte (s. Abb.11 S.22), stellte sich die Frage, ob die Flussrichtung die Filtration beeinflusste. Im Verhältnis waren die Hämatokritwerte nach der 1. Filtration durchschnittlich 1,4% gegenüber der Hämatokritwerte nach der 2. Filtration erhöht. Mit einem Blutfluss von oben nach unten sind jedoch ebenfalls ausreichende Hämatokritwerte erreichbar und der Blutfluss durch den HF Filter ist somit in beide Richtungen möglich.

C.2.7 Bestimmung des Restblutanteils im HF Filter

Es wurden zwei weitere Versuche durchgeführt. Diese entsprachen in ihrem Aufbau bezüglich der Wahl der Abstände sowie der Position für die Integration des Leukozytenfilters den beiden Versuchsvarianten mit den besten erzielten Ergebnissen. Die Leukozytenfiltration erfolgte für den Versuch 27 somit nach der 2. Filtration über den HF Filter, entsprechend des Versuchsablaufs der Versuche 25 und 26. Dem Aufbau der Versuche 18 und 19 folgend, wurde der Leukozytenfilter für den Versuch 28 nach der Vollblutkonserve angebracht (s. Abb. 13). In den beiden Versuchen sollte der Anteil des Blutes bestimmt werden, das sich nach den

Filtrationsdurchgängen noch im HF Filter befand. Dies geschah über Auswiegen des HF Filters vor und nach den Filtrationen. Bei diesen Versuchen floss die additive Lösung nach Abschluss der Filtrationen über den HF Filter in das erhaltene Erythrozytenkonzentrat. Diese Spülung sollte die Nutzung des sich noch in den Hohlfasern befindlichen Erythrozytenkonzentrats bewirken. Außerdem wurde überprüft, ob der routinemäßig zur Leukozytenfiltration eingesetzte Pall Filter sich auch für die integrierte Leukozytenfiltration bei der Blutkomponentenherstellung mit der HF Filtration eignet.

Vergleich verschiedener Leukozytenfilter in der Anwendung der integrierten Leukozytenfiltration bei der Blutkomponentenherstellung:

Für die vorausgegangen Versuche war der Leukozytenfilter von Maco Pharma verwendet worden, welchen eine elastische äußere Hülle umgibt (s. Abb.9 S.18). Der nun benutzten Pall Filter hat dagegen ein Gehäuse aus hartem Plastik. Der ebenfalls aus einer harten Hülle bestehende Leukozytenfilter von Fresenius hatte sich nicht für die Integration des Filters in den Ablauf der Blutkomponentenherstellung mit dem HF Filter bewährt. Bei seiner Anwendung war es zu einer Stagnation des Blutflusses im Filter gekommen. Als Grund wurde eine zu massive Erhöhung des Widerstandes durch die harte Hülle vermutet, welcher sich zu dem Widerstand durch die Hintereinanderschaltung der Filter summierte. Das Umstellen auf einen Leukozytenfilter mit elastischer Hülle ließ das Blut ohne Probleme passieren. Der von einer harten Schale umgebene Pall Filter sollte wegen seiner heute häufigen Anwendung für die Leukozytenfiltration auch in seiner Verwendung für die Blutkomponentengewinnung durch HF-Filtration überprüft werden. Es kam zu einem störungsfreiem Durchfluss, wodurch neben dem Filter von Maco Pharma, auch der Pall Filter verwendet werden konnte.

Ermittlung der Plasamenge im Filteraußenraum und des Restblutanteils im Hollow Fiber Filter nach der zweiten Filtration :

Nach Abschluss der zweiten Filtration wurde das sich im Außenraum des HF Filters befindende Plasma in den Sammelbeutel abgelassen. Über Auswiegen des HF Filters vor bzw. nach dem Ablassen sollte diese Plasamenge bestimmt werden. Der HF Filter mit enthaltener Kochsalzlösung wog im unbenutzten Zustand ca. 172 g. Nach Abschluss des zweiten Filtrationsdurchganges war das Gewicht des Filters, inklusive Blut in den Hohlfasern und Plasma im Außenraum, ca. 190 g. Wurde das Plasma abgelassen, hatte der Filter noch ein Gewicht von ca. 149 g, womit die Differenz von ca. 41 g dem Gewichtsanteil des Plasmas entsprach. Untersucht wurde auch die Menge an Blut, welche sich nach Abschluss der

Filtrationsdurchgänge noch in den Hohlfasern des HF Filters befand. Den Erythrozytenkonzentraten wurde nach Beendigung der zweiten Filtration additive Lösung zugegeben. Hierfür wurde der Additivbeutel nach den Filtrationsdurchgängen über dem HF Filter befestigt und das Additivum über die Hohlfasern in den Erythrozytenbeutel abgelassen. Über diesen Schritt sollte gleichzeitig eine Spülung der Hohlfasern vorgenommen werden. Es wurde das Gewicht des HF Filters bei leerem Filteraußenraum vor und nach den Filtrationen bestimmt. Der unbenutzte HF Filter wog nach dem Ablassen der Kochsalzlösung aus dem Filteraußenraum ca. 132 g. Nach der 2. Filtration wog der HF Filter nach dem Ablassen des Plasmas aus dem Filteraußenraum ca. 149 g. Der Anteil des in den Hohlfasern verbleibenden Blutes, lässt sich durch die Gewichts Differenz von ca. 17g jedoch nur grob abschätzen.

C.2.8 Anmerkungen zu den Hämatokritwerten nach Zugabe von Additivum

Alle bisher aufgeführten Hämatokritwerte sind ohne die Zugabe von additiver Lösung angegeben worden. Bei sieben Versuchen wurde nach der zweiten Filtration 110ml SAG-M oder 110ml PAGGS-M Additivlösung zu den erhaltenen Erythrozytenkonzentraten beigefügt. Die danach zu erwartenden Hämatokritwerte sollten in einem Bereich von 50 % - 70 % liegen (s. Tab. 7).

Tabelle 7: Ergebnisse der Versuche nach der 2. Filtration und Additiv Zugabe

Versuch	Gewicht des Erythrozytenkonzentrates	Hämatokrit	Hämatokrit plus 110ml Additivum
10	357 g	57,8 %	42,4 %
13	341 g	54,0 %	40,3 %
18	251 g	72,7 %	54,1 %
20	306 g	68,2 %	45,0 %
25	415 g	72,4 %	41,4 %
27	367 g	72,5 %	54,7 %
28	359 g	68,0 %	63,7 %*

*Anmerkung: möglicherweise fehlerhafte Messwertbestimmung

Bei einem mittleren Hämatokritwert von 60 % des Erythrozytenkonzentrates mit additiver Lösung und einer Wiederfindungsrate von ca. 70 % nach der Transfusion, ist mit einem

Ansteigen des Hämatokritwertes um ca. 3-4 % zu rechnen. Würde ein Konzentrat verabreicht, welches nur einen mittleren Hämatokrit von 45 % aufweist, könnte nur ein Zugewinn an ca. 2,6 % erreicht werden.

Nach der Zugabe von 110 ml additiver Lösung konnte nur bei einem Teil der erhaltenen Erythrozytenkonzentrate ein ausreichend hoher Hämatokritwert (HKT > 50%) erreicht werden (s. Tab.7). Zur Optimierung der Ergebnisse sind noch weitere Versuche erforderlich.

Bei Hämatokritwerten nach der 2. Filtration von unter 60% kam es zu einem starken Abfallen der Werte nach der Zugabe von additiver Lösung. Die Durchmischung der Erythrozytenkonzentrate mit der additiven Lösung erfolgte manuell. Die schlechten Ergebnisse der Hämatokritwerte von 45,0 % bzw. 41,4 % (Versuche 20 bzw. 25) nach der Zugabe von additiver Lösung sind bei Ausgangswerten von 68,2 % bzw. 72,4 % möglicherweise auf eine unzureichende Durchmischung der Konserven zurückzuführen.

C.3 Optimierungsversuche zur Verbesserung der Plasmagewinnung und zur Festlegung der Abstände des Plasmabeutels bzw. des Beutels 2F

C.3.1 Steigerung der Plasmagewinnung

Es wurden die Auswirkungen der Entfernung des in dem HF Filter befindlichen Kochsalzlösung auf die Plasmagewinnung untersucht (Versuch 8). Die Kochsalzlösung wurde hierfür bereits vor der Filtration des Blutes über den HF Filter abgelassen. Dieses Vorgehen war mit einer Blockierung der Filtration des Plasmas verbunden. Erst nach erneuter Auffüllung des HF Filters mit Kochsalzlösung ließ sich diese wieder herstellen.

Ein kontinuierliches Ablassen der Kochsalzlösung nach dem Einsetzen der Plasmafiltration, bis zur Füllung des Außenraumes des HF Filters mit Plasma, war problemlos möglich. Durch das Sammeln der Kochsalzlösung in einen Extrabeutel konnte eine Verdünnung des Plasmas verhindert werden. Die bessere Alternative wäre einen HF Filter zu verwenden bei welchem nur die Filtermembranen mit Kochsalzlösung benetzt sind.

Durch Belüftung des HF Filters, konnte die nach der zweiten Filtration gewonnene Plasmamenge um das im Außenraum des HF Filters angesammelte Plasma, gesteigert werden. Für die klinische Anwendung dieses Verfahrens müsste der HF Filter mit einem Belüftungsventil versehen werden, das die Sterilität der Blutprodukte gewährt.

Anmerkung zum Plasma: Da zelluläre Bestandteile durch die Membranen des HF Filters zurückgehalten werden, ist von einem zellfreien Plasmafiltrat auszugehen. Das erhaltene Plasmafiltrat mit einem mittleren Volumen von 254 ml war klar und unauffällig. Bei optimiertem Versuchsaufbau zeigten sich visuell keine Zeichen einer Hämolyse. Nähere Untersuchungen zur Qualität des Plasmas wurden nicht durchgeführt.

C.3.2 Wahl der Abstände des Plasmabeutels bzw. des Beutels 2F

Versuche mit unterschiedlichen Abständen des Beutels 2F zum HF Filter ergaben keine Auswirkungen der Entfernung auf die zu gewinnende Erythrozytenkonzentration bzw. den Hämatokrit. Der Beutel 2F wurde während der zweiten Filtration in einem Abstand von 10 cm unterhalb des HF Filters angebracht. Die gleiche Entfernung wurde auch für den Beutel 1F während der ersten Filtration gewählt.

Um einen gleichmäßigen Abfluss des Plasmas während der Filtration zu ermöglichen, wurde der Plasmabeutel für die gesamte Versuchsreihe unterhalb des HF Filters angebracht. Verschieden gewählte Abstände hatten keinen Einfluss auf die zu gewinnende Plasmamenge gezeigt, so dass der Plasmabeutel, aus Gründen des praktischen Versuchsaufbaus, in einem Abstand von 85 cm Entfernung vom unteren Ausflussventil des HF Filters zum Boden befestigt wurde.

C.4 Tabellarische Darstellung der Ergebnisse

Tabelle 8: Ergebnisse der Versuche 1 bis 9

Lauf. Versuchsnummer	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6	Versuch 7	Versuch 8	Versuch 9
Konserve Nr.	2027906	2027927	2027920	2027875	2028060	2028067	2028523	2027879	2028185
Alter der Konserve	Frisch	Frisch	Frisch	Frisch	Frisch	Frisch	Frisch	Frisch	Frisch
Versuchaufbau	Kein Leukofilter	Kein Leukofilter	3 Filtrationen	4 Filtrationen	Kein Leukofilter				
Vollblutbeutel Firma	Fresenius	Fresenius	Fresenius	Fresenius	Fresenius	Fresenius	Fresenius	Fresenius	Fresenius
Ausgangsgewicht Vollblut	542 g	535 g	535 g	537 g	529 g	539 g	509 g	535 g	483 g
Hämatokrit Vollblut	34,8%	40,6%	39,8%	36,2%	34,4%	30%	37,3%	33,8%	32,3%
Leucofilter Firma	keiner	keiner	keiner	keiner	keiner	keiner	keiner	keiner	Maco Pharm
Erybeutel I Firma	Maco Pharma	Maco Pharma	Maco Pharma	Maco Pharma	Maco Pharma	Fresenius	Maco Pharma	Maco Pharma	Maco Pharma
Abstand Vollblut / Säule	18 cm	23 cm	22 cm	35 CM	9cm	20 cm	20 cm	25 cm	30 cm
Laufzeit	18 min	18 min	11 min	20 min	28 min	25 min	31 min	./.	12 min
Hämatokrit Ery I	39,4%	56%	44,5%	./.	49,9%	59,3%	./.	47,0%	49,6%
Umdrehen der Ery-Beutel	1 X	1 X	3 X	4 X	1 X	1 X	1 X	1 X	1 X
Erybeutel II Firma	Maco Pharma	Maco Pharma	Maco Pharma	Fresenius	Maco Pharma	Fresenius	Maco Pharma	Maco Pharma	Maco Pharma
Abstand Erybeutel I Säule	Variabel	Variabel	41 cm	Variabel	9 cm	20 cm	40 cm	9 cm	40 cm
Laufzeit	18 min	35 min	16 min	./.	40min	40min	51 min	./.	17 min
Hämatokrit Ery II	55%	68,5%	58,1%	./.	67,2%	69,1%	64,5%	62,8%	63,4%
Abstand Erybeutel II Säule	Variabel	Variabel	50 cm	Variabel	11cm	11cm	10 cm	26 cm	10 cm
Gesamtlaufzeit	36 min	53 min	27 min	./.	68 min	65 min	82 min	55 min	29 min
Netto Gewicht	420 g	287 g	255 g	./.	237 g	261 g	241 g	282 g	227 g
Hämatokrit Ery III	./.	./.	73,6%	63%	./.	./.	./.	./.	./.
Plasmabeutel Firma	Maco Pharma	Maco Pharma	Maco Pharma	Maco Pharma	Maco Pharma	Fresenius	Maco Pharma	Maco Pharma	Maco Pharma
Plasma Abstand Säule	Variabel	Variabel	Variabel	35 cm	65 cm	85 cm	85 cm	0 / 80 cm	85 cm
Netto Gewicht	180 g	295 g	313 g	./.	323 g	330 g	256 g	338 g	289 g

Tabelle 9: Ergebnisse der Versuche 10 bis 18

Lauf. Versuchs Nr.	Versuch 10	Versuch 11	Versuch 12	Versuch 13	Versuch 14	Versuch 15	Versuch 16	Versuch 17	Versuch 18
Konserve Nr.	20285525	2028190	2028662	2028663	2028059	2028058	2028191	2028170	2028788
Alter der Konserve	Frisch	Frisch	Frisch	Frisch	Frisch	gekühlt	Frisch	Frisch	Frisch
Versuchaufbau	Kein Leukofilter	Vorher über Leukofilter	Leukofilter nach Vollblut						
Vollblutbeutel Firma	Fresenius	Fresenius							
Temperatur Vollblut	23,5°C		26°C	24,5°C					
Ausgangsgewicht Vollblut	497 g	467 g	536 g	503 g	./.	534 g	494 g	490 g	534 g
Hämatokrit Vollblut	33%	37,7%	36,6%	36,7%	35,2%	45,3%	39,2%	34,0%	36,2%
Leucofilter Firma	keiner	Maco Pharm							
Erybeutel I Firma	Maco Pharma	Maco Pharma							
Abstand Vollblut / Säule	30 cm	40 cm	40 cm	40 cm	40 cm	7 cm	50 cm	20 cm	100 cm
Laufzeit	14 min	10 min	23 min	15 min	./.	40 min	17min	14 min	./.
Hämatokrit Ery I	37,9%	54,6%	55,6%	53,9%	51,8%	59,0%	58,5%	54,4%	55,3%
Umdrehen der Ery-Beutel	1 X	1 X	1 X	1 X	1 X	1 X	1 X	1 X	1 X
Erybeutel II Firma	Maco Pharma	Maco Pharma							
Abstand Erybeutel I Säule	40 cm	125 cm	50/40 cm	40 cm	40 cm				
Laufzeit	18 min	15 min	40 min	20 min	./.	Abbruch	45min	24 min	./.
Hämatokrit Ery II	57,8%	67,4%	70,5%	54,0%	67,1%	./.	67,9%	67,1%	72,7%
Abstand Erybeutel II Säule	10 cm	10 cm							
Gesamtlaufzeit	32 min	25 min	63 min	35 min	24 min	./.	62min	38 min	./.
Netto Gewicht	357 g+Add	233 g	253 g	341 g+Add	./.	328 g	./.	./.	251 g
Hämatokrit Ery II incl. Add.	42,40%			40,3%					54,10%
Plasmabeutel Firma	Maco Pharma	Maco Pharma							
Plasma Abstand Säule	85 cm	85 cm							
Netto Gewicht	263 g	253 g	280 g	253 g	279 g	242 g	./.	282 g	247 g

Tabelle 10: Ergebnisse der Versuche 19 bis 26

Lauf. Versuchs Nr.	Versuch 19	Versuch 20	Versuch 21	Versuch 22	Versuch 23	Versuch 24	Versuch 25	Versuch 26
Konserve Nr.	2028989	2028788	2028059	2028543	2027893	2027803	2028966	2028995
Alter der Konserve	Frisch	vom Vortag	Frisch	Frisch	Frisch	Frisch	Frisch	Frisch
Versuchaufbau	Leukofilter nach Vollblut	Leukofilter nach Vollblut +Metallkammer	Leukofilter vor HF Filter	Leukofilter vor HF Filter	Leukofilter unter HF Filter	Leukofilter unter HF Filter	Leukofilter vor Beutel 2F	Leukofilter vor Beutel 2F
Vollblutbeutel Firma	Fresenius	Fresenius	Fresenius	Fresenius	Fresenius	Fresenius	Fresenius	Fresenius
Ausgangsgewicht Vollblut	533 g	525 g	528 g	520 g	540 g	519 g	540 g	522 g
Temperatur Vollblut	28,5 °C	24,5°C		./.			27,5 °C	26°C
Hämatokrit Vollblut	39,1%	34,4%	38,4%	./.	35,2%	36,0%	33,5%	40,8%
Leucofilter Firma	Maco Pharma	Maco Pharma	Fresenius	Maco Pharma	Maco Pharma	Maco Pharma	Maco Pharma	Maco Pharma
Erybeutel I Firma	Maco Pharm	Maco Pharm	Maco Pharm	Maco Pharm	Maco Pharm	Maco Pharm	Maco Pharm	Maco Pharm
Abstand Vollblut / Säule	80 cm	80 cm	90 cm	80 cm	22 cm	45 cm	40 cm	40 cm
Laufzeit	45 min	35 min	Abbruch	Abbruch	62 min	19 min	27 min	20 min
Hämatokrit Ery I	./.	52,3%	./.	./.	29,2%	33,3%		56,6%
Umdrehen der Ery-Beutel	1 X	1 X	1 X	1 X	1 X	1 X	1 X	1 X
Erybeutel II Firma	Maco Pharma	Fresenius+ Add	Maco Pharma	Fresenius +Add	Maco Pharma	Fresenius	Fresenius +Add	Maco Pharma
Abstand Erybeutel I Säule	40 cm	40 cm	40 cm	40 cm	30 cm	30 cm	40 cm	40 cm
Laufzeit	40 min	40 min	Abbruch	Abbruch	./.	./.	21 min	21 min
Hämatokrit Ery II	73,8%	68,2%	./.	./.	./.	./.	72,4%	72,1%
Abstand Erybeutel II Säule	10 cm	10 cm	10 cm	10 cm	variabel	variabel	10 cm	10 cm
Gesamtlaufzeit	85 min	75 min	Abbruch	./.	62 min	./.	48 min	41 min
Netto Gewicht	234 g	306 g+Add	./.	./.	387 g	447 g	415 g+Add	226 g
Hämatokrit Ery II incl. Add.	./.	45,00%	./.	./.	./.	./.	41,40%	Entfällt
Plasmabeutel Firma	Maco Pharma	Maco Pharma	Maco Pharma	Maco Pharma	Maco Pharma	Maco Pharma	Maco Pharma	Maco Pharma
Plasma Abstand Säule	85 cm	85 cm	85 cm	85 cm	30cm	62 cm	85 cm	85 cm
Netto Gewicht	254 g	282 g	./.	./.	164g	175 g	268 g	224 g

D Diskussion

D.1 Optimierungsversuche

Zur Zeit beruhen die Standardverfahren zur Herstellung der Blutkomponenten entweder auf der Zentrifugation nach der Entnahme von Vollblut oder der Hämapherese. Beide Gewinnungsmethoden werden maschinell betrieben. Somit ist das Vorhandensein einer Energiequelle in Form von Elektrizität unbedingt erforderlich. Der Raumbedarf ist für beide Techniken nicht unerheblich und beträgt für die Durchführung einer Hämapherese mindestens 10 m². In einer Blutspendezentrale werden für die Gewinnung des Erythrozyten- bzw. Plasmakonzentrats mittels Zentrifugation mindestens 90 Minuten benötigt. Allerdings, kann die Separation der Blutkomponenten, durch die Transportwege, bis zu 24 Stunden verzögert sein. Bei der Hämapherese beträgt die Zeit für die Fraktionierung des Blutes während der Spende ca. 30 Minuten und die Durchführung der Hämapherese ist mit dem Vorhandensein einer Maschine, der Anwesenheit einer examinierten Pflegekraft und der Bereitschaft eines Notarztteams verbunden. Darüber hinaus sollte ein Operator für höchstens drei Separationen gleichzeitig zuständig sein. Weiterhin sind die Kosten für die Anschaffung dieser Gerätschaften sehr hoch und liegen bei ca. 50.000-60.000 € für einen Separator bzw. eine Zentrifuge, so dass sich diese Techniken nur an bestimmten Instituten befinden.

Innerhalb der Versuchsreihe der vorliegenden Arbeit sollte eine alternative Methode zu den Standardverfahren für die Blutkomponentenherstellung geschaffen werden. Die Herausforderung war, den für die Hämodialyse bereits verwendeten HF Filter auch für die Gewinnung von Blutkomponenten einzusetzen. Für die Durchführung dieses Projekts wurden nur Arbeitsmaterialien verwendet, wie sie im klinischen Alltag bereits vorkommen und erprobt sind. Der Filter musste in keiner Weise für diesen Zweck verändert werden und wurde lediglich in seiner ursprünglichen Funktion als Hämodialysefilter um die der Blutkomponentengewinnung erweitert. Der von der Firma Dideco verwendete Filter besitzt einen Innendurchmesser von 330 µm, eine Wandstärke von 150µm und eine Porengröße von 0,2 - 0,5 µm. Für die Apparatur dieses Verfahrens wird das geschlossene Beutelsystem mit darin integriertem Leukozytenfilter, welches für die Blutkomponentenherstellung mit den Standardverfahren benutzt wird und der HF Filter verwendet. Die verschiedenen Beutel werden über Schlauchverbindungen an den HF Filter angeschlossen. Somit ist dieses Verfahren ohne aufwendige Materialbeschaffung und geringen Arbeitsaufwand leicht konstruierbar. Für die klinische Anwendung muss die Apparatur jedoch sterilisiert werden und als geschlossenes System angeboten werden. Die gewonnenen Erythrozytenkonzentrate sollten, gemäß der Vorschriften zu den „Richtlinien zur Gewinnung

von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten“ bzw. dem Transfusionsgesetz (48) nach Zugabe der Stabilisatoren (Additiv Lösung) Hämatokritwerte von 50 % bis 70 % haben. Ein einmaliges Filtrieren über den HF Filter resultierte mit relativ niedrigen Hämatokritwerten (Mittelwert HKT: 49,9 % (ohne Additiv)). Der Einsatz eines längeren HF Filters, um unter Anwendung des Verfahrens den gewünschten Hämatokrit durch ein einmaliges Filtrieren zu erzielen, führte zu einer Stagnation des Blutflusses. Versuche, die in ihrem Aufbau aus einer direkten Anbringung des Leukozytenfilters vor dem HF Filter bestanden, zeigten ebenfalls nicht den gewünschten Erfolg. Vermutlich kam es durch das direkte Hintereinanderschalten der Filter bzw. durch die Verlängerung des HF Filters zu einer unüberwindbaren Erhöhung des Widerstandes für den Blutfluss.

Daher stellte sich die Frage, ob ein zweimaliges Filtrieren die Hämatokritwerte der gewonnenen Erythrozytenkonzentrate auf über 70 % anheben würde, so dass durch die Zugabe von additiver Lösung zur Erhaltung der Funktionalität der Erythrozyten, die Hämatokritwerte nicht unter 50 % absinken würden. In den ersten Versuchen wurden zunächst die Auswirkungen mehrmaligen Filtrierens auf den Hämatokritwert untersucht. Durch ein dreimaliges Filtrieren über den gleichen HF Filter konnte der Hämatokritwert erstmalig auf über 70 % (ohne Additiv) gesteigert werden. Es kam jedoch auch zu einer Verzögerung der Gesamtlaufzeit. Unter Berücksichtigung des Zeitfaktors wurden die folgenden Versuche mit zweimaligen Filtrieren durchgeführt und durch weitere Optimierungsschritte konnten Hämatokritwerte von über 70 % erreicht werden.

Zunächst wurden verschiedene Abstände der Beutel zum HF Filter gewählt und deren Effekt auf den Hämatokrit und die Laufzeit überprüft. Für die erste Filtration war die Anbringung des Vollblutbeutels zum HF Filter in einem Abstand von über 30 cm erfolgreich, da die Laufzeit der Filtration mit ca. 15 min deutlich verkürzt werden konnte. Durch den dadurch erzeugten schnelleren Blutfluss über den HF Filter blieb die Effizienz der Filtration bzw. der gewünschte Hämatokritwert konstant. Die Anbringung des Beutels 1F (s. Abb. 12 S.23) für die zweite Filtration zeigte ebenfalls eine Abhängigkeit der benötigten Laufzeit von den Abständen zum HF Filter, so dass die Laufzeit bei einer Erhöhung der Entfernung auf 40 cm, um die Hälfte reduziert werden konnte. Bei der ersten Filtration durchfloss das Blut den HF Filter von unten nach oben, während der Blutstrom bei der zweiten Filtration von oben nach unten folgte. Dies führte zu der Überlegung, ob sich die Filtrationseffizienzen der beiden Filtrationen unterschieden. In den optimierten Versuchen zeigte sich im Vergleich der jeweils nach der ersten bzw. zweiten Filtration bestimmten Hämatokritwerte nur ein minimal höherer Hämatokrit für die erste Filtration.

Neben der Laufzeit und dem notwendigen Hämatokrit war auch das mögliche Auftreten einer sichtbaren Hämolyse ein wichtiges Kriterium für die genaue Festlegung der Abstände. Um die Laufzeit bestmöglichst zu minimieren, wurden die Abstände der Beutel zum HF Filter weiter vergrößert. Während der ersten Filtration kam es auch bei Entfernungen von 100 cm der Vollblutkonserve zum HF Filter nicht zu einer sichtbaren Hämolyse. Bei der zweiten Filtration trat dagegen bereits bei einem Abstand von 50 cm eine optische Hämolyse auf. Dieser Effekt lässt sich möglicherweise durch eine erhöhte Empfindlichkeit der Erythrozyten nach der ersten Filtration für ein nochmaliges Filtrieren erklären. Um eine Hämolyse zu vermeiden, durfte der Abstand von 40 cm des Beutels 1F zum HF Filter nicht überschritten werden. Die Wahl der Abstände der Beutel zum HF Filter war somit von großer Bedeutung. Ein zu geringer Abstand verzögerte die Laufzeit erheblich und eine zu weite Entfernung führte zur Hämolyse während der zweiten Filtration.

Nachdem die ersten Versuche ohne Leukozytenfilter durchgeführt worden waren, wurde für die weiteren Versuche ein Leukozytenfilter integriert. Dadurch wurde die für die Anwendbarkeit von Erythrozytenkonzentraten geforderte Leukozytendepletion während den HF Filtrationen ermöglicht. Es wurde versucht die optimale Position für den Leukozytenfilter zu ermitteln, um die aufgestellten Kriterien einer möglichst schnellen Leukozytendepletion und einer störungsfreien Erythrozytenfiltration zu erfüllen. Es wurde der Leukozytenfilter von Maco Pharma verwendet. Heute ist durch die neueren Leukozytenfilter (z. Bsp. Asahi) eine wesentlich schnellere Leukozytendepletion möglich. Alle zugelassenen Leukozytenfilter sind in ihrer Filtrationseffizienz hinreichend geprüft worden, so dass die von den Richtlinien geforderte Restleukozytenzahl ($< 1 \times 10^6$ /Einheit) in Erythrozytenkonzentraten mit ihrer Anwendung zu erreichen ist. Hinsichtlich der Anbringung des Leukozytenfilters waren nur die Versuche erfolgreich, bei denen der Leukozytenfilter entweder nach der Vollblutkonserve mit Zwischenbeutel oder vor dem Beutel 2F integriert wurde (s. Abb. 13 S. 28). Dagegen mussten die Versuche, bei denen der Leukozytenfilter unmittelbar vor dem HF Filter positioniert war, abgebrochen werden, da kein Durchfluss des Blutes über den HF Filter stattfand. Durch das direkte Hintereinanderschalten der Filter kam es offensichtlich zu einem starken Anstieg des Widerstandes, so dass das Filtrieren des Blutes über die Hohlfasern nicht möglich war. Ungünstig waren auch die Ergebnisse der Versuche bei denen der Leukozytenfilter nach dem HF Filter vor dem Beutel 1F integriert worden war, so dass die Leukozytenfiltration sich an die erste Filtration anschloss (s. Abb. 13 S.28). Es kam dabei zu einem Absinken der Hämatokritwerte unter die Ausgangswerte, wobei die Ursache nicht geklärt werden konnte. Die Variante den Leukozytenfilter nach dem HF Filter zu integrieren, wurde auch in weiteren

Versuchen untersucht. Der Unterschied bestand jedoch in der zeitlichen Abfolge, da die Leukozytenfiltration sich nun nicht an die erste Filtration, sondern erst an die zweite Filtration anschloss. Diese Vorgehensweise war erfolgreich und führte zu guten Ergebnissen in den Hämatokritwerten. Der Blutfluss war bei dieser Filterkonstellation erleichtert, da das Blut die beiden hintereinander angebrachten Filter von oben nach unten durchfloss. Versuche in denen die Leukozytenfiltration vor der ersten Filtration erfolgte und das Blut den HF Filter von unten nach oben durchfloss, erbrachten ebenfalls gute Hämatokritwerte. Als gute Positionen für den Leukozytenfilter ergaben sich demnach die Platzierung vor dem Beutel 2F nach der zweiten HF Filtration (Abb.13) und auch die Anbringung nach der Vollblutkonserve mit Zwischenbeutel vor der ersten HF Filtration (Abb.13). In diesen Versuchen wurden mit Hämatokritwerten von über 70 % die höchsten Werte erzielt.

Es stellte sich die Frage, ob bei der Verwendung von zunächst nicht leukozytendepletiertem Blut eine Beeinträchtigung der Filtrationseffizienz in dem HF Filter entstehen könnte. Durch die im Blut enthaltenen Leukozyten könnte eine Blockierung der Poren der Filtermembranen verursacht werden. Es wurde untersucht, ob der Zeitpunkt der Leukozytendepletion in Bezug auf die HF Filtration eine Bedeutung für die Hämatokritwerte hatte. In mehreren Versuchen wurde die Leukozytenfiltration vor der HF Filtration durchgeführt. Diese Versuche waren mit Hämatokritwerten von 72,7 % bzw. 73,8 % erfolgreich und zeigten jedoch nur minimale bessere Hämatokritwerte als Versuche bei welchen erst nach der HF Filtration leukozytendepletiert wurde. Somit verursachen die im Vergleich zu den Erythrozyten wesentlich größeren Leukozyten in einer im Normbereich liegenden Anzahl im Blut, offenbar keine Einschränkung der Plasmafiltration bzw. der Erythrozytenkonzentration. Bei der Durchführung der Leukozytendepletion vor der HF Filtration ist dementsprechend nur von einem leichten positiven Effekt auf die Hämatokritwerte der Erythrozytenkonzentration auszugehen. Vergleiche der höchsten Hämatokritwerte von Versuchen mit Leukozytenfiltration vor bzw. nach der HF Filtration haben eine Differenz von 1% ergeben. Dies deutet darauf hin, dass der Zeitpunkt der Leukozytenfiltration für die Hämatokritwerte nur von geringer Bedeutung ist.

In einem Versuch wurde der Leukozytenfilter zusätzlich von einer Metallkammer umschlossen, um eine Beschleunigung der Leukozytenfiltration durch geringere Aufblähung des Filterbeutels und stärkeren Gegendruck durch das Metallgehäuse zu erzielen. Die Leukozytendepletion wird durch die Metallkammer nicht beeinträchtigt. Es zeigte sich jedoch keine Verkürzung der Leukozytenfiltrationszeit und somit auch keine Zeiteinsparung in der Gesamtlauzeit.

In einem weiteren Versuch sollte durch das Ablassen der im Außenraum des HF Filters befindlichen Kochsalzlösung, eine Erhöhung der Plasmafiltration bewirkt werden. Durch die

fehlende Benetzung der Filtermembranen, kam es jedoch zu einem Erliegen der Plasmafiltration. Um eine Verdünnung des Plasmas zu verhindern, wurde die Kochsalzlösung kontinuierlich in einen Extrabeutel abgelassen. Das Ablassen der Kochsalzlösung begann nach dem Einsetzen der Plasmafiltration und endete nach der Füllung des Außenraumes des HF Filters mit Plasma. Für die klinische Anwendung sollten HF Filter benutzt werden, bei welchen nur die Filtermembranen mit Kochsalzlösung benetzt sind. Die Verwendung von HF Filtern mit Kochsalzlösung im Außenraum führt zu einer Kontamination des Plasmas mit Kochsalzlösung. Das, sich nach Abschluss der Filtrationsdurchgänge im Außenraum des HF Filters befindende Plasma, wurde über Belüftung in den Plasmabeutel abgelassen. Für den klinischen Gebrauch wäre ein steriles Ventil am HF Filter erforderlich.

Zusammenfassend sollte die Vollblutkonserve einen Abstand von 30 cm zum HF Filter nicht unterschreiten, um eine kurze Laufzeit für die erste Filtration zu erreichen. Zum gleichmäßigen Sammeln des Erythrozytenkonzentrates genügt es, den Beutel 1F bei der ersten Filtration bzw. 2F bei der zweiten Filtration unterhalb des HF Filters zu befestigen. In der Versuchsreihe wurden Abstände von ca. 10 cm gewählt. Der Beutel 1F sollte für die zweite Filtration in einer Entfernung von 40 cm zum HF Filter befestigt werden, da sich mit diesem Abstand eine kurze Laufzeit erzielen lässt. Die Empfindlichkeit für eine Hämolyse ist für die zweite Filtration gegenüber der ersten Filtration stark erhöht. Deshalb sollte ein Abstand von 40 cm für die Anbringung des Beutels 1F während der zweiten Filtration nicht überschritten werden. Akzeptable Hämatokritwerte können durch ein zweimaliges Filtrieren über den HF Filter erreicht werden. Zum gleichmäßigen Sammeln des Plasmas sollte sich der vorgesehene Beutel unterhalb des HF Filters befinden. Als beste Positionen für den Leukozytenfilter ergaben sich die Anbringung nach der Vollblutkonserve vor dem ersten Filtrationsdurchgang, sowie vor dem Beutel 2F nach dem zweiten Filtrationsdurchgang. Für die Variante der Anbringung des Leukozytenfilters nach der zweiten Filtration wurde mit ca. 45 Minuten eine kürzere Gesamtlaufzeit ermittelt.

Für das zweimalige Filtern der Blutkonserve über den HF Filter, einschließlich der Leukozytenfiltration bis zum Erhalten der Blutkomponenten werden durchschnittlich zwischen 45 Minuten (Leukozytenfiltration nach 2. Filtration) und 80 Minuten (Leukozytenfiltration vor 1. Filtration) benötigt. Das gewonnene Erythrozytenkonzentrat zeigt im Durchschnitt ein Volumen von 262ml ohne additive Lösung und von 322 ml nach der Zugabe von additiver Lösung. Der mittlere Hämatokrit der optimierten Versuche beträgt 71,84 % ohne additive Lösung. Bei Hämatokritwerten von über 72 % konnten nach der Zugabe von additiver Lösung

Hämatokritwerte von ca. 54 % bestimmt werden. Das gewonnene Plasmavolumen erreicht einen mittleren Wert von 254 ml.

D.2 Vorteile der Hollow Fiber Filter Methode

An die Blutkomponentengewinnung mit Hilfe des Hollow Fiber Filters sollten die gleichen Bedingungen hinsichtlich der Qualität der Endprodukte (s. Tab.1 S. 12) gestellt werden, wie sie auch für die Standardverfahren gelten. Die durch die „Hollow Fiber Filtrations-Methode“ erhaltenen Erythrozytenkonzentrate zeigten unter optimalen Bedingungen keine sichtbare Hämolyse. Für die integrierte Leukozytenfiltration wurden zugelassene Leukozytenfilter verwendet. Der eingesetzte Filter ist ein gewöhnlich zur Hämodialyse eingesetztes Modell, welches ohne Modifikation, die Gewinnung von Blutkomponenten (Erythrozyten- und Plasmakonzentrat) ermöglicht. Da die Filter bereits für den klinischen Einsatz in der Dialyse produziert werden, sind keine zusätzlichen Kosten für die Entwicklung dieser Technik erforderlich. Außerdem zu erwähnen ist die leichte Handhabung dieser Separationsmethode und der geringe räumliche Aufwand.

Der Hauptvorteil dieser Art von Separation ist jedoch die Unabhängigkeit von jeglicher äußerer Energiezufuhr. Die Hollow Fiber Methode gelingt lediglich durch Diffusion und Konvektion über die semipermeable Membran unter Ausnutzung der Schwerkraft. Durch diesen Umstand stellt sie zur Zentrifugation und Hämapherese an einigen Orten der Welt die einzige Möglichkeit dar, um Blutkomponenten zu gewinnen. So ist die Herstellung von Blutkomponenten über den HF Filter überall dort ausführbar, wo Elektrizität nicht oder nur unzureichend vorhanden ist und eine direkte Anwendung der Konserven benötigt wird. Es ist auch in Ländern anwendbar in welchen der Einkauf einer Zentrifuge oder Hämaphereseapparats im Verhältnis zur Häufigkeit im Gebrauch die Anschaffungskosten nicht tragen würde oder die nötigen Geldmittel gar nicht erst zur Verfügung stehen würden. Möglicherweise könnte die vorgestellte Methode auch eine Unterstützung für die Organisation der Blutspendezentralen in Deutschland bedeuten. Die Herstellung von Blutkomponenten könnte am Ort der Blutspende durchgeführt werden. Die Blutkonserven wären nicht langen Transportwegen ausgesetzt, welches die Qualität beeinträchtigen kann, sondern würden ohne Zeitversäumnis direkt zu separieren sein.

D.3 Zur Entwicklung der Hollow Fiber Filter Methode

Versuchsdurchführungen, deren Ausgangspunkt die Hypothese war, ob eine Separation von Blutkomponenten auch mit einem Filtersystem möglich wäre, wurden 1990 von einer japanischen Arbeitsgruppe des Hokkaido Red Cross Blood Center beschrieben (54). Es wurde die Gewinnung von Plasma mit einem Hollow Fiber System dargestellt. Damals wurde ein Filter aus 800 Polyethylenhohlfasern mit einer Länge von 200 mm, einer Membrandicke von 30 μm und einer Porengröße von 0,2 μm verwendet. Die erhaltenen Produkte zeigten ein Plasmavolumen von 176 ml, ein Erythrozytenkonzentrat von 274 ml und einen Hämatokritwert von durchschnittlich 62%. Eine Leukozytendepletion war bei der damaligen Versuchsreihe jedoch nicht vorgesehen gewesen, so dass die heute geltende Bedingung der Richtlinien für die Restleukozyten in der Konzentratherstellung nicht gewährleistet sind. Bei einem zellfreiem Plasma, beinhaltete das Erythrozytenkonzentrat über 80% der Thrombozyten und über 98% der weißen Blutzellreihe. Durch das Vorhandensein der Leukozyten im Erythrozytenkonzentrat ist der Einsatz dieses Verfahrens nicht mehr möglich. Als mit den Versuchsdurchführungen der hier vorgestellten Arbeit begonnen wurde, lagen keine weiteren Publikationen vor. Basierend auf dieser Methode wurde mittlerweile von der Firma Heim die sogenannte „Sangofer Apparatur“ vorgestellt (55). Diese setzt sich aus einem Beutelsystem mit integriertem Leukozytenfilter (WBF 2) und einem speziell für die Blutkomponentenherstellung entwickelten HF Filter zusammen. Der benutzte Filter besteht aus 650 Polyethylenhohlfasern mit einer Wanddicke von ca. 100 μm und er hat eine Porengröße von 0,5 μm . Die Hohlfasern sind parallel in Form einer einfachen Schleife im Separator angeordnet. Es wurden Hämatokritwerte von 57% (mit additiver Lösung), Erythrozytenkonzentratvolumen von 321ml (mit additiver Lösung) und Plasmavolumen von 291 ml erreicht.

Der wesentliche Unterschied der in dieser Arbeit beschriebenen Methode zum Sangofer Verfahren beruht auf der Verwendung verschiedener Filter. Für die hier vorgestellte Methode musste kein spezieller Filter konstruiert werden. Der für die Hämodialyse verwendete HF Filter konnte ebenfalls für die Blutkomponentengewinnung genutzt werden. Durch seinen Einsatz in der Hämodialyse ist er leicht verfügbar und in seiner Wirkung auf Blut bereits bewährt. Bei der Anwendung des Sangofer Filters wird nur ein Filtrationsdurchgang benötigt. Dies wird durch die Hohlfaserschleife ermöglicht. Nach Abschluss der Filtration wird in der Hohlfaserschleife möglicherweise mehr Erythrozytenkonzentrat zurückgehalten, als durch den HF Filter. Die Anwendung des für die Hämodialyse verwendeten HF Filters für die Blutkomponentenherstellung erfordert zwei Filtrationen, die durch ein einfaches Umhängen der

Beutel und der Verwendung desselben HF Filters durchgeführt werden. Die senkrechte Anordnung der Hohlfasern erleichtert das Abfließen des Erythrozytenkonzentrats aus dem HF Filter.

D.4 Ausblick

Nachdem die Herstellung von Erythrozytenkonzentrat und Plasma durch den Hollow Fiber Filter durchführbar ist, könnte auch die Gewinnung von Thrombozytenkonzentrat möglich werden. Bei dem hier verwendeten HF Filter konnten keine Thrombozyten in das Plasma gelangen, da die Filterbarriere mit einer Porengröße von 0,2 - 0,5 μm für die einen Durchmesser von 2 - 3,5 μm besitzenden Thrombozyten nicht passierbar war. Um thrombozytenhaltiges Plasma zu erhalten, müsste man einen HF Filter mit größerem Porendurchmesser zur Verfügung haben, wodurch dann lediglich die Erythrozyten zurückgehalten werden würden. Für die Durchführung einer Thrombozytenfiltration mit dem HF Filter ist der Zeitpunkt der integrierten Leukozytenfiltration zu beachten, da der überwiegende Teil der Thrombozyten durch den Leukozytenfilter absorbiert wird. Wie die Versuche gezeigt haben, wird die Filtrationseffizienz des HF Filters bzw. die Hämatokritwerte durch im Blut enthaltene Leukozyten nicht wesentlich beeinträchtigt. Dies ermöglicht es zunächst die Thrombozyten und das Plasma von den Erythrozyten zu separieren, um erst nach der zweiten Filtration die Leukozytendepletion durchzuführen.

Der große Vorteil der Hollow Fiber Methode im Vergleich zu den Standardverfahren ist, dass die Blutkomponentengewinnung nur unter Ausnutzung der Schwerkraft möglich ist und keine äußere Energie benötigt wird. Dadurch kann dieses Verfahren sehr vielfältig eingesetzt werden. Ein anderes Modell zur Blutkomponentenherstellung verwendet das hier vorgestellte Prinzip, ohne auf die Schwerkraft angewiesen zu sein. Im Innern einer doppelhalsigen „Flasche“ mit mehreren Ein- und Auslassstellen befinden sich superhydrophobe Filterplatten, die die „Flasche“ in verschiedene Kompartimente unterteilen. Über mehrere Filter unterschiedlicher Porositäten werden die Blutbestandteile durch einen Vakuumsog getrennt, wodurch auch die direkte Separation am Spender möglich ist. Durch das Unabhängigsein von der Schwerkraft, könnte durch dieses Verfahren die Blutkomponentenherstellung auch in der Weltraumforschung möglich werden. Die klinische Erprobung steht jedoch noch aus.

D.5 Zusammenfassung

Der Grundgedanke dieser Versuchsreihe war den für die Hämodialyse verwendeten HF Filter für die Blutkomponentenherstellung zu nutzen. Dieses Ziel konnte auch erreicht werden und es wurde somit eine Methode entwickelt, welche im Gegensatz zu den an äußere Energiequellen gebundenen Standardverfahren, nur unter Ausnutzung der Schwerkraft funktioniert. Das erhaltene Erythrozytenkonzentrat und das Plasma sollten für die Zulassung in ihrer Qualität den durch Zentrifugation und Hämapherese erhaltenen Blutprodukten entsprechen. Die vollständige Überprüfung der laut der Richtlinien aufgeführten Kriterien sollte durch weitere Untersuchungen erfolgen.

Für die Durchführung wurde eine Apparatur konstruiert die sich aus Bestandteilen des geschlossenen Beutelsystems und dem Hollow Fiber Filter zusammensetzt.

Es sollte ein Erythrozytenkonzentrat mit einem akzeptablen Hämatokrit (50 - 70%) hergestellt werden. Nachdem durch die ersten Versuche der grundsätzliche Versuchsaufbau für das Gelingen der Filtration über den HF Filter experimentell ermittelt war, wurden die Versuche in ihrem Aufbau bzw. Ablauf weiter optimiert. Dabei wurden zunächst verschiedene Abstände der einzelnen Beutel zum HF Filter gewählt, um die Bedingungen für eine bestmögliche Filtrationsleistung zu schaffen. Durch die Optimierung können akzeptable Hämatokritwerte erreicht werden. In die Betrachtungen miteinbezogen war, auch eine möglichst kurze Filtrationszeit zu erreichen. Es wurden obere Grenzwerte für die Abstände der Beutel zu dem HF Filter bestimmt, bei deren Einhalten es zu keiner Hämolyse kam.

Die Erythrozytenkonzentrate müssen vor ihrer Verabreichung an die Patienten leukozytendepletiert sein, um mögliche Nebenwirkungen minimal zu halten. Unter dieser Voraussetzung wurde ein Leukozytenfilter in den Versuchsaufbau integriert und sein Einfluss auf die Filtrationsleistung des HF Filters an verschiedenen Positionen der Apparatur untersucht.

Für das erfolgreiche Durchführen der Filtration von Vollblutkonserven über den HF Filter sind einige Kriterien zu berücksichtigen. Der Abstand des Vollblutes zum HF Filter sollte nicht unter 30 cm betragen , damit es nicht zu einer großen Verzögerung in der Filtrationszeit kommt. Um eine Hämolyse zu vermeiden, sollte die Entfernung des Beutels 1F zum HF Filter 40 cm für die zweite Filtration nicht überschreiten. Als gute Standorte für den Leukozytenfilter haben sich die Anbringung nach der Vollblutkonserve vor der ersten HF Filtration und die Position vor dem Beutel 2F nach der zweiten Filtration ergeben. Die Leukozytendepletion ließ sich zügig durchführen und die HF Filtration wurde nicht beeinträchtigt.

Der Einsatz eines HF Filters mit größerem Porendurchmesser könnte auch die Gewinnung von Thrombozytenkonzentrat möglich machen. Da der größte Teil der Thrombozyten durch den Leukozytenfilter bereits absorbiert würde, ist eine Leukozytenfiltration erst nach der zweiten Filtration durchzuführen. Eine wesentliche Minderung der Filtrationseffizienz des HF Filters durch im Blut enthaltene Leukozyten wurde nicht festgestellt. Ein auf der vorgestellten HF Filter Methode beruhendes Verfahren nutzt anstatt der Schwerkraft einen Vakuumsog für die Blutkomponentenherstellung. Dieses sich noch im Experimentierstadium befindende Projekt könnte die HF Methode auch für die Weltraumforschung nutzbar machen.

Die Anwendung des für die Hämodialyse verwendeten Hollow Fiber Filters für die Gewinnung von Blutkomponenten, ermöglicht neben den Standardverfahren eine neue Methode der Herstellung. Dieses Verfahren zeichnet sich durch die Verwendung von Materialien aus, die im klinischen Alltag bereits vorkommen, durch seine einfache Handhabung, geringen personellen Aufwand, niedrige Kosten und durch seine Unabhängigkeit von äußeren Energiequellen, ist es prinzipiell überall anwendbar. Es sollte der prinzipielle Ablauf des Verfahrens vorgestellt werden, wobei der Hollow Fiber Filter mit dem Beutelsystem für die klinische Anwendung noch in ein geschlossenes System überführt werden muss.

E Literaturverzeichnis

1. Hippokrates, De morbis I, Kap 30 (VI, 200 Litre[^]).
2. Garrison FH. An introduction to the history of medicine. Philadelphia: WB Saunders, 1928:50.
3. Zimmermann LM, Howell KM. History of blood transfusion. *Ann Med Hist* 1932;4:415-433.
4. Steudel J (1942) Der Marasmus senilis und die Geschichte der Alterskrankheiten. *Med Welt* 16: 932-935, 957-961; ders (1942) Zur Geschichte der Lehre von den Greisenkrankheiten. *Sudhoffs Archiv für die Geschichte der Medizin und der Naturwissenschaften* 35: 1-27; ders (1956) Gerokomie. *Dtsch Med J* 7:89-91; ders (1965) Historischer Abriss der Geriatrie. In: Doberauer W, Doberauer A (Hrsg) *Handbuch der praktischen Geriatrie*, Bd 1. Stuttgart, S 1-13.
5. Mathew AH. Life and Times of Roderigo Borgia, 1912:66. Cited by Keynes G, p3; and Kilduffe and DeBakey, p 18.
6. Gesellius F. Die Transfusion des Blutes. Eine historische, kritische und physiologische Studie. Leipzig: F. Wagner, 1873. Cited by Keynes, p 4; and Maluf NSR. History of blood transfusion. *J Hist Med Allied Sci* 1954;9:79.
7. Ullersperger JB. Ancient transfusion and infusion compared with modern transfusion, infusion and hypodermic or subcutaneous injections; translated by Charles F. Wittig. Philadelphia, from Chaille SE. *Miscellanies*, 1867-69. Cited by Kilduffe and DeBakey, p 18.
8. Libavius A. Appendix necessaria syntagmatis arcanorum chymicorum contra. Frankfurt: Heningum Sheunemanum, 1615; IV:8. Cited by Drinkard WB. History and statistics of the operation of transfusion of blood. *Richmond Louisville Med J* 1972;13(1), p 22; Keynes, p4; Maluf, p59; and Wiener, p 50 (translation).

9. Maluf NS. History of blood transfusion. *J Hist Med Allied Sci* 1954;9:59-107.
10. Scheel P. Die Transfusion des Blutes und Einspritzung der Arzeneien in die Adern, historisch und in Rücksicht auf die praktische Heilkunde bearbeitet. 2 vols. Copenhagen: F.Brunner, 1802-03. Cited by Doan, p 5; Kilduffe and DeBakey, p 17; Maluf, p72; and Wiener, p 50.
11. Wren C. An account of the rise and attempts, of a way to convey liquors immediately into the mass of blood. *Philos Trans R Soc Lond* 1665; 1: 128-130.
12. Lower R. The success of the experiment of transfusing the blood of one animal into another. *Philos Trans R Soc Lond* 1666; 1: 352.
13. Lower R (1669) a a O, S 186:>>(canis) in gramine sese volutare, non aliter omnino, neque majore incommodi aut offensae indicio, quam si in profluentem solummodo conjectus fuisset.<<
14. Blundell J. Experiments on the transfusion of blood by the syringe. *Med Chir Trans* 1818;9:56-92.
15. Kronecker H, Sander J: Bemerkung über lebensrettende Transfusion mit anorganischer Salzlösung bei Hunden. *Berl Klin Wochenschr* 1879;52:767.
16. Starling EH: On the absorption of fluids from the connective tissue spaces. *J Physiol* 1895-1896;19:312-326. Reproduction 1953.
17. Creite A (1869) Versuche über die Wirkung des Serumeiweißes nach Injektion in das Blut. *Z Ration Med* 36: 90-108 .
18. Shattock SG (1900) Chromocyte clumping in acute pneumonia. *J Pathol Bacteriol* 6: 303-314.

19. Landsteiner K (1900) Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. Centralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskh Abt 27: 357-362.
20. Eisenberg P (1901) Über Isoagglutinine und Isolysine in menschlichen Seris. Wien Klin Wochenschr 14:1020-1024; Landsteiner K, Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes, a a O, 1132-1134.
21. von Decastello A, Sturli A : Über die Isoagglutinine im Serum gesunder und kranker Menschen. Münch Med Wochenschr 1902; 49:1090-1095.
22. Reichsgesundheitsamt: Einführung einer internationalen einheitlichen Bezeichnung für die menschlichen Blutgruppen. Münch Med Wochenschr 1928; 75:1484- 1485.
23. Landsteiner K (1931) Individual differences in human blood. Science 73: 403- 409.
24. Hunter J (1794) A treatise on the blood, inflammation and gunshot wounds, London ; Magendie F, Vorlesungen über das Blut (übersetzt von Krupp G, Leipzig 1839).
25. Bischoff TLW (1835) Beiträge zur Lehre von dem Blute und der Transfusion desselben. Arch Anat Physiol Wiss Med J: 347-372.
26. Hewson W (1771) Experimental inquiries into the properties of the blood. London
27. Hewson W (1780) Vom Blute, seinen Eigenschaften und einigen Veränderungen desselben in Krankheiten. Nürnberg, Zweiter Versuch (ohne Seitenzählung).
28. Müller J (1835) Handbuch der Physiologie des Menschen, Bd 1. Koblenz, S. 96, 104.
29. Landois L (1875) Die Transfusion des Blutes. Leipzig.
30. Crile G: Direct transfusion of blood in the treatment of hemorrhage. JAMA 1907;47:1482-1484

31. Payr Zur Technik der arterio-venösen Bluttransfusion. Münch Med Wochenschr 1912;59/I:793-794.
32. Oehlecker F (1928) Ist die Bluttransfusion völlig ungefährlich, wenn vorher eine Blutgruppenbestimmung gemacht worden ist ? Med Klin 24: 1421- 1424. Vgl dens (1933) Die Bluttransfusion. Berlin
33. Wederhake: Überpflanzung (Transfusion) von Blut. Münch Med Wochenschr, Feldärztl Beilage,1917;64 II:1471-1473
34. Wright AE: Remarks on methods of increasing and diminishing the coagulability of the blood with special reference to their therapeutic employment. BMJ 1894;2:57-61.
35. Fantus B: The therapie of the Cook County Hospital: Blood preservation. JAMA1937;109:128-131.
36. Greenwalt TJ: A short history of transfusion medicine. Transfusion 1997;37:550-563.
37. Bagdassarov AA, Guljajev AW: Bluttransfusion. Berlin, Volk und Gesundheit, 1958.
38. Sachs V: Einst und jetzt: Bluttransfusion: Münch Med Wochenschr 1968;110:73-79.
39. SchillingV: Blutübertragung und Konservierung. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin,52. Kongreß 1940:202-224.
40. Seibert FB: Fever-producing substance found in some distilled waters. Am J Physiol 1923;67:90-104
41. Walters CW, Murphy WP Jr. A closed gravity technique for the preservation of whole blood in ACD solution utilizing plastic equipment. Surg Gynecol Obstet 1952;94:687-692.
42. Loutit JF, Mollison PL. Advantages of a disodium-citrate-glucose mixture as a blood preservative. Br Med J 1943;2:744-745.

43. Cohn EJ. The separation of blood into fractions of therapeutic value. *Ann Intern Med* 1947;26:341-352.
44. Kendrick DB. Blood program in World War II. US Government Printing Office, 1964:922.
45. Pool JG, Shannon AE. Produktion of high-potency concentrates of antihemophilic globulin in a closed-bag system. *N Engl J Med* 1965; 273:1443-1447.
46. TUI, C., F.C. BARTTER, A.M. Wright, R. B.HOLT: Red cell reinfusion and the frequency of plasma donations. Preliminary report of multiple donations in eight weeks by each of six donors. *JAMA* 124: 331 (1944).
47. Judson, G., A. Jones, R. Kellog, D. Bruckner, R. Eisel, S. Perry, W. Grennough: Closed continuous flow centrifuge. *Nature* 217: 816 (1968).
48. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie), aufgestellt gemäß Transfusionsgesetz von der Bundesärztekammer im Einvernehmen mit dem Paul- Ehrlich- Institut (2005)
49. Sato, H., P.S. Malchesky, S. Matsubara, Y. Nose: Characterization of polyethylene membrane for plasma separation . *Artif. Org.* 7: 213 (1983).
50. Sato, H., P.S. Malchesky, Y. Nose : Characterization of polyethylene membrane for plasma separation. *Artif. Org.* 7: 428 (1983).
51. Dieter, K.: Stofftransportvorgänge bei der Blutreinigung mit künstlichen Nieren. *Verfahrenstechnik* 12: 670 (1978)
52. Streicher, E.,H.Schneider: Stofftransport bei Hämodiafiltration. *Nieren-und Hochdruckkrankh.* 12: 339-342 (1983)
53. Ofsthun, N. J., C. K. Colton: Visual evidence of concentration polarization in cross-flow membrane plasmapheresis. *ASAIO Trans.* 33:51-517 (1987).

54. Sekiguchi S, Takahashi TH, Yamamoto S, Hasegawa H, Takenaka Y, Suemitsu J, Fukumi H: A new type pf blood component collector: plasma separation using gravity without any electrical devices. Vox Sang 1990; 58:182-187

55. 2005 Blackwell Publishing Ltd. Vox Sanguinis(2005) 89,81-85

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung

Hiemit erkläre ich , Sibylle Latza, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.