

Aus der
Universitätsklinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie Tübingen

Erhöhte Methämoglobinbildung gelagerter Erythrozyten
während extrakorporaler Zirkulation in Abhängigkeit von der
vorausgegangenen Lagerungszeit bei 4°C

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Heß, geb. Roth, Heike Alexandra

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. P. Wendel

2. Berichterstatter: Professorin Dr. M. Philipp

Tag der Disputation: 08.02.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	3
Tabellenverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung.....	6
1.1 Grundlagen: Blutbestandteile und deren Aufgaben.....	6
1.1.1 Erythrozyten.....	6
1.1.1.1 Osmotische Resistenz	6
1.1.1.2 Eryptose.....	7
1.1.1.3 Erythrozytenparameter.....	8
1.1.2 Transportfunktion.....	9
1.1.2.1 Formen des Hämoglobins	10
1.1.3 Pufferfunktion.....	11
1.2 Fragestellung und klinische Relevanz der Arbeit	12
2 Material und Methoden	16
2.1 Versuchsschema.....	16
2.2 Material	18
2.2.1 Erythrozytenkonzentrat.....	18
2.2.2 Verwendete Zusätze.....	19
2.2.3 Herz-Lungen-Maschine	21
2.3 Versuchsablauf und erhobene Parameter.....	23
2.3.1 Versuchsablauf	23
2.3.2 Bestimmung des Blutbildes	24
2.3.3 Blutgasanalyse	24
2.3.4 Bestimmung der osmotischen Resistenz.....	25
2.3.5 Parameter der Eryptose.....	28
2.3.5.1 Bestimmung des Zellvolumens	28
2.3.5.2 Bestimmung der Phosphatidylserinexposition.....	28
2.3.5.3 Bestimmung des intrazellulären Calciumspiegels	29
2.4 Auswertung	29
3 Ergebnisse.....	30

3.1	Erythrozytenparameter (Blutbild).....	30
3.2	pH-Wert der Erythrozytenkonzentrate	30
3.3	Sauerstoffsättigung der Erythrozytenkonzentrate	32
3.4	Methämoglobinanteil der Erythrozyten	33
3.5	Osmotische Resistenz.....	36
3.6	Parameter der Eryptose	37
3.6.1	Zellvolumen	37
3.6.2	Phosphatidylserinexposition	38
3.6.3	Intrazellulärer Calciumspiegel.....	39
4	Diskussion	40
5	Zusammenfassung	54
6	Literaturverzeichnis.....	56
7	Anhang	60
7.1	Erklärung zum Eigenanteil	60
7.2	Veröffentlichungen	61
7.3	Danksagung	61
7.4	Lebenslauf.....	62

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Versuchsschema am Beispiel der Versuchsreihe V1	17
Abbildung 2: Versuchsaufbau der Herz- Lungen- Maschine	22
Abbildung 3: Beispiel für die graphische Ermittlung der NaCl- Konzentration der 50%igen Hämolyse	27
Abbildung 4: pH-Werte der Erythrozytenkonzentrate	30
Abbildung 5: pH- Werte (Versuchsreihe 2)	31
Abbildung 6: Sauerstoffsättigung der Erythrozytenkonzentrate	32
Abbildung 7: Methämoglobinanteil der Ek ohne Zusätze	33
Abbildung 8: Methämoglobinanteil der Ek mit den Zusätzen Vitamin E, Trolox und Desferal	34
Abbildung 9: Methämoglobinanteil von drei Eks nach 6h Zirkulation in der HLM	35
Abbildung 10: NaCl- Konzentration der 50%igen Hämolyse der Erythrozyten .	36
Abbildung 11: Forward Scatter der Erythrozyten	37
Abbildung 12: Annexin-V-Bindung der Erythrozyten	38
Abbildung 13: Fluo3- Fluoreszenz der Erythrozyten	39
Abbildung 14: Hämoglobinoxidation und Bildung von ROS	45
Abbildung 15: Die Rolle von NAD ⁺ bei der Glykolyse von Erythrozyten	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: NaCl- Konzentrationen der Verdünnungsreihe zur Testung der osmotischen Resistenz	25
Tabelle 2: Übersicht ausgewählter reaktiver Sauerstoffspezies mit Summenformeln	41

Abkürzungsverzeichnis

1,3-/ 2,3-BPG	1,3-/ 2,3- Bisphosphoglycerat
3PG	3- Phosphoglycerat
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	„arbitrary units“, willkürliche Einheit
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GAP-DH	GAP-Dehydrogenase
Glucose-6-P	Glukose-6-Phosphat
Ek	Erythrozytenkonzentrat
fl	Femtoliter
Hb	Hämoglobin
HCT	Hämatokrit
HLM	Herz-Lungen-Maschine
LDH	Laktatdehydrogenase
LPO	Lactoperoxidase
MCH	„mean corpuscular hemoglobin“, mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt
MCHC	„mean corpuscular hemoglobin concentration“, mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	„mean corpuscular volume“, mittleres Zellvolumen der Erythrozyten
MDA	Malondialdehyd
MetHb	Methämoglobin
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
NADPH	Nicotinsäureamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
OxyHb	Oxyhämoglobin
P	Phosphat

pCO ₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PEP	Phosphoenolpyruvat
PTR	„posttransfusion recovery“
ROS	„reactive oxygen species“, Reaktive Sauerstoffspezies
sO ₂	Sauerstoffsättigung
SOD	Superoxiddismutase

1 Einleitung

1.1 Grundlagen: Blutbestandteile und deren Aufgaben

Menschliches Blut besteht aus zellulären Bestandteilen und dem Blutplasma. Bei den Blutzellen lassen sich Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten unterscheiden.

Das Blut und seine Bestandteile übernehmen im Körper eine Vielzahl von lebenswichtigen Aufgaben. So sind neben der Immunabwehr und der Blutgerinnung auch die Aufrechterhaltung des pH-Wertes und vor allem die Transportfunktion des Blutes für Gase, Nährstoffe und Hormone zu nennen.

1.1.1 Erythrozyten

Erythrozyten sind kernlose Zellen, die den Hauptteil der Blutzellen ausmachen. Sie sind scheibenförmig mit zentraler Eindellung und haben einen Durchmesser von ca. 7,5µm. Sie sind auf Grund ihrer Form ideal für den Sauerstofftransport im Blut geeignet (siehe Kapitel Transportfunktion) und besitzen außerdem eine gute Verformbarkeit. Diese Eigenschaft verlieren die Erythrozyten allerdings, und nach 90-120 Tagen Überlebenszeit werden sie aus der Blutbahn entfernt. Hierbei werden die überalterten Erythrozyten in Milz, Leber und Knochenmark abgebaut. (Königshoff, 2007; Lang and Lang, 2007)

1.1.1.1 Osmotische Resistenz

Die osmotische Resistenz bezeichnet die Widerstandsfähigkeit eines Erythrozyten in einem hypotonen Umgebungsmedium. Gibt man Erythrozyten in eine hypotone NaCl-Lösung, so gelangt durch Osmose Flüssigkeit ins Zellinnere, der Erythrozyt wird bis zur Kugelform aufgebläht. Bei einer NaCl- Konzentration von 0,34% kommt es bei allen Zellen zu Membrandefekten mit Hämoglobinaustritt; es liegt eine vollständige Hämolyse vor. (Huppelsberg and Walter, 2009; Lang and Lang, 2007)

1.1.1.2 Eryptose

Neben der Hämolyse ist der suizidale Erythrozytentod die zweite Möglichkeit zur Eliminierung von Erythrozyten. Die sogenannte Eryptose wird durch verschiedene Faktoren stimuliert, u.a. zählen hierzu oxidativer Stress und hyperosmotischer Schock.

Sie ist gekennzeichnet durch Schrumpfung der Zelle, Blebbing (Bläschenbildung) der Zellmembran und Exponierung von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche durch „Scrambling“ der Zellmembranphospholipide. „Scrambling“ beschreibt hierbei die Translokation von Phosphatidylserin von der inneren auf die äußere Schicht der Zellmembran durch das Transportprotein Scramblase.

Erhält der Erythrozyt ein Signal zur Eryptose, werden, z.B. durch oxidativen Stress, unselektive Kationenkanäle aktiviert. Durch hyperosmotischen Schock erfolgt eine Ausschüttung von Prostaglandin E₂, was ebenso die Öffnung unselektiver Kationenkanäle verursacht. Dadurch kommt es zu einem intrazellulären Ca²⁺-Anstieg. Dies führt zu weiteren Effekten. Zum einen wird das Enzym Scramblase aktiviert, welches Phosphatidylserin von der inneren Schicht der Zellmembran auf die Außenseite führt. Zum anderen wird das Enzym Calpain, welches Spektin und Ankyrin an der Zellmembran abbaut, aktiviert, was durch den Abbau des Zytoskeletts zum Blebbing der Membran führt. Weiterhin werden Calcium-abhängige Kaliumkanäle aktiviert, wodurch es zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran kommt. Dies versucht die Zelle durch Chloridausstrom zu kompensieren, was aber eine extrazelluläre Hyperosmolarität verursacht, die zu Wasserverlust und damit der Schrumpfung der Zelle führt. (Lang and Lang, 2015; Lang et al., 2012)

1.1.1.3 Erythrozytenparameter

Hämatokrit (HCT)

Der Hämatokrit ist definiert als der Volumenanteil aller Blutzellen am gesamtem Blutvolumen. Der Hämatokrit kann als Parameter für das Volumen der Erythrozyten genutzt werden, da diese 99% des Volumens der Blutzellen ausmachen.

MCH (mean corpuscular hemoglobin)

Das MCH ist die mittlere Hämoglobinmasse in einem Erythrozyten und errechnet sich aus der Hämoglobinkonzentration geteilt durch die Erythrozytenzahl. Der Normalbereich liegt bei 28-32 pg.

MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration)

Das MCHC gibt die Hämoglobinkonzentration bezogen auf das Erythrozytenvolumen an. Das MCHC wird berechnet indem man die Hämoglobinkonzentration durch den Hämatokriten teilt. Die Norm liegt zwischen 320-360 g/l.

MCV (mean corpuscular volume)

Das MCV ist das mittlere Volumen eines Erythrozyten. Es wird errechnet aus Hämatokrit geteilt durch die Erythrozytenzahl. Normalerweise beträgt es 80-100fl.

1.1.2 Transportfunktion

Für den Transport von Sauerstoff sind die Erythrozyten verantwortlich. Diese sind durch ihre verhältnismäßig große Oberfläche ideal für den Gasaustausch geeignet. Sie übernehmen 99% des im Blut vorhandenen Sauerstoffs, nur ca. 1% des Sauerstoffs liegt im Blut gelöst vor. Die Bindung des Sauerstoffs an den Erythrozyten erfolgt über das Protein Hämoglobin. Dieses besteht aus vier Untereinheiten mit je einer Proteinkette (Globin) und einem Häm-Ring, der ein Fe^{2+} - Ion besitzt. Dieser Häm-Ring ist die eigentliche Bindungsstelle für den Sauerstoff. Ein Hämoglobinmolekül kann also vier Sauerstoffmoleküle binden. Das Eisenion wird bei der Bindung nicht oxidiert, es handelt sich hierbei um eine Oxygenierung. Ist eine Bindungsstelle des Hämoglobins mit Sauerstoff besetzt, so erleichtert dies durch eine Konformationsänderung des Proteins die Anlagerung weiteren Sauerstoffs an die übrigen Bindungsstellen. Aus diesem sogenannten kooperativen Effekt resultiert ein S-förmiger Verlauf der Sauerstoffbindungskurve, welche die Abhängigkeit der Sauerstoffsättigung vom Sauerstoffpartialdruck im Gewebe zeigt. Die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins wird von einigen Faktoren beeinflusst. So führen ein steigender Kohlenstoffdioxidpartialdruck, eine steigende H^+ -Konzentration (fallender pH-Wert), steigende Temperatur und eine steigende Konzentration von 2,3 Bisphosphoglycerat im Erythrozyten zu einer Abnahme der Affinität, also einer erleichterten Sauerstoffabgabe bei gleichem Sauerstoffpartialdruck. Diese Abhängigkeit der Sauerstoffaffinität von pH und pCO_2 ist der sogenannte Bohr-Effekt.

Auch durch eine Anlagerung von Kohlenmonoxid wird die Sauerstoffbindung beeinträchtigt. Kohlenmonoxid hat eine etwa 300-mal höhere Affinität zum Hämoglobin und verdrängt somit den Sauerstoff aus den Bindungsstellen. Der Transport von Kohlenstoffdioxid erfolgt auf drei verschiedenen Wegen. Ca. 80% werden als Bikarbonat transportiert, 10% in physikalischer Lösung und weitere 10% werden an Aminogruppen des Hämoglobins gebunden (Carbamino-Hämoglobin).

1.1.2.1 Formen des Hämoglobins

Beim Desoxyhämoglobin liegt das Eisenatom des Häms in seiner zweifach positiv geladenen Form vor und das Hämoglobin ist in der Lage Sauerstoff zu binden. Damit erhält man Oxyhämoglobin.

Wird das Fe^{2+} -Ion im Hämoglobin jedoch zu Fe^{3+} oxidiert, so verliert es gänzlich seine Fähigkeit Sauerstoff zu binden. Oxygeniertes Hämoglobin ($\text{HbFe}^{2+} \text{O}_2$, bzw. HbFe(II)O_2) ist ein relativ stabiles Molekül, es kommt aber zu einer Autoxidation von circa 0,5-3% des oxygenierten Hämoglobins zu Methämoglobin (auch Hämioglobin, HbFe^{3+} , bzw. HbFe(III)) pro Tag. (Kanas and Acker, 2010). MetHb kann lediglich Wasser binden.

Im Körper sorgt ein Enzym der Erythrozyten, die Methämoglobinreduktase, für eine Rückführung des Eisenions in seine zweifach positiv geladene Form.

Durch die Reaktion mit Wasserstoffperoxid unter oxidativem Stress kann das Hämoglobin in seine vierfach-positiv geladene Form gebracht werden, sogenanntes Ferryl-Hämoglobin.

1.1.3 Pufferfunktion

Für die längerfristige Aufrechterhaltung des pH- Wertes im Blut unterscheidet man das respiratorische (Beeinflussung über den $p\text{CO}_2$) und das metabolische System (Beeinflussung über Pufferbasen, z.B. in der Niere). Die Puffersysteme im Blut sind vorwiegend für die akute Regulierung des pH- Wertes zuständig. Hierbei werden Schwankungen durch Substanzen mit Puffer- eigenschaften ausgeglichen.

Das bedeutendste System ist der Bikarbonat- Puffer. Bikarbonat ist die wichtigste Pufferbase, da seine Konzentration im Blut recht hoch ist und es sich bei diesem System um ein offenes System handelt. Das System folgt der Gleichung: $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$, dabei kann entstehendes CO_2 abgeatmet und der Bikarbonatgehalt des Blutes über die Niere reguliert werden. Zweiteres geschieht allerdings wesentlich langsamer.

Weiterhin spielt das Proteinat- Puffersystem eine wichtige Rolle bei der Puffer- funktion des Blutes. Dieses System besteht aus ionisierbaren Seitenketten von Aminosäuren in Proteinen. Hier ist auf Grund seiner hohen Konzentration im Blut vor allem das Hämoglobin zu nennen. Desoxygeniertes Hämoglobin kann dabei Protonen besser abpuffern als oxygeniertes, da desoxygeniertes Hämoglobin mehr CO_2 in Form von Carbamino-Hämoglobin binden und mehr Protonen ab- puffern kann.

Als drittes Puffersystem im Blut ist der Phosphat-Puffer zu nennen. Er spielt eine geringere Rolle, da im Plasma eine niedrige Konzentration der beteiligten Phos- phate herrscht. Das Phosphat-Puffersystem funktioniert nach der Gleichung: $\text{H}^+ + \text{HPO}_4^{2-} \leftrightarrow \text{H}_2\text{PO}_4^-$.

(Huppelsberg and Walter, 2009; Lang and Lang, 2007)

1.2 Fragestellung und klinische Relevanz der Arbeit

Von den in Deutschland transfundierten Blutkomponenten (Erythrozytenkonzentrate, Thrombozytenkonzentrate und Plasmen) machen die Erythrozytenkonzentrate den weitaus größten Teil aus. In den Jahren 2000 bis 2015 wurden in Deutschland jährlich rund vier Millionen Erythrozytenkonzentrate verbraucht, bis 2011 sogar mit steigender Tendenz auf fast 4,5 Millionen. (Funk and Heiden, 2017)

Im Gegensatz dazu steht die Verfügbarkeit von Blutprodukten. So waren beispielsweise im Jahr 2006 nur 4% der zur Blutspende fähigen Personen wiederholt als Vollblutspender aktiv. (Ritter et al., 2008) Hinzu kommt in Zukunft außerdem der demographische Wandel der Bevölkerung. Studien prognostizieren auf Grund der älterwerdenden Bevölkerung einen deutlich erhöhten Bedarf an Erythrozytenkonzentraten (25% mehr Erythrozytenkonzentrate in Mecklenburg-Vorpommern bis 2020 im Vergleich zu 2005, 10% bis 30% mehr Erythrozytenkonzentrate in Baden-Württemberg bis 2030 im Vergleich zu 2007) und gleichzeitig einen Rückgang der zur Blutspende zur Verfügung stehenden Menschen (27% weniger in Mecklenburg-Vorpommern bis 2020 im Vergleich zu 2005, 11% weniger in Baden-Württemberg bis 2030 im Vergleich zu 2007). (Greinacher, 2007; Seifried, 2011)

Neben der Motivierung der Bevölkerung zur Blutspende ist es demnach umso wichtiger, die zur Verfügung stehenden Blutkonserven, insbesondere auch die Erythrozytenkonzentrate, verantwortungsvoll und bestmöglich einzusetzen. Gleichzeitig muss besonderes Augenmerk auf die Qualität der Blutprodukte, und damit auch auf die Lagerungsfähigkeit derselben gelegt werden.

Benötigt werden Bluttransfusionen häufig auch bei Operationen, bei denen der Einsatz von extrakorporaler Zirkulation nötig ist. Hierbei sind die Blutzellen besonderer Belastung ausgesetzt und es gilt zu erreichen, dass auch unter diesen besonderen Umständen keine vermeidbaren Schädigungen der Erythrozyten auftreten.

Bei Erythrozytenkonzentraten kommt es, abhängig von der Lagerungsdauer, zu Veränderungen bzw. Lagerungsschäden, sogenannten „storage lesions“. Hierzu zählen biochemische und morphologische Veränderungen.

Bei gelagerten Erythrozyten schreitet der Verbrauch von ATP und 2,3-BPG weiter voran. Diese Verbindungen stabilisieren normalerweise die desoxygenierte Form des Hämoglobins, ihr Rückgang sorgt also für eine erhöhte Sauerstoffaffinität des Hämoglobins. Andererseits wird, da die Glykolyse in den gelagerten Erythrozyten auch bei 4°C langsam weiter voranschreitet und somit der pH-Wert aufgrund der freiwerdenden Protonen sinkt, die Sauerstoffabgabe des Hämoglobins erleichtert (Bohr-Effekt). Der mit der Zeit sinkende pH-Wert hat umgekehrt allerdings auch wiederum eine Verlangsamung der Glykolyse zur Folge. Durch die Glykolyse kommt es zu einem Anstieg der Laktatkonzentration.

Des Weiteren wird das NADH/NAD⁺-Verhältnis beeinflusst. NADH wird benötigt, um oxidiertes Eisen (Fe³⁺) wieder zu Fe²⁺ und damit Methämoglobin wieder in Hämoglobin umzuwandeln.

Weiterhin hat die Lagerung eine Abnahme des S-Nitrosohämoglobins (Transportform des NO) der Erythrozyten und damit eine Abnahme der erythrozyteninduzierten Vasodilatation zur Folge.

Die verminderte Temperatur bei der Lagerung inaktiviert die Na⁺ /K⁺ -Pumpen der Zellmembran. Dies führt zu einem intrazellulären Kalium- und damit auch Calciumanstieg. Aufgrund des Mangels an ATP wird Ca²⁺ nicht mehr ausreichend aus der Zelle gepumpt und es kommt zu den einleitenden Schritten der Eryptose. Phosphatidylserin wird vermehrt auf die Außenseite der Zellmembran geführt, und Calpain wird aktiviert, was den Abbau des Zytoskeletts zur Folge hat und zum Blebbing der Membran führt.

Durch die Abschnürung von Mikrovesikeln an der Zellmembran, um schädigende Komponenten zu eliminieren, kommt es zu einer Formveränderung der Erythrozyten (Echinozyten, Sphärozyten) und damit auch zu einer verminderten Verformbarkeit, welche die Erythrozyten für den Sauerstofftransport ungeeignet macht und zu frühzeitigem Abbau der Zellen führt.

Weiterhin führt die Lagerung von Erythrozyten zu einer verminderten Glutathionkonzentration und erhöhten Glutathion-Disulfid-Werten. Glutathion wird benötigt, um beispielsweise Proteine und Membranlipide vor reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS), insbesondere vor H_2O_2 , zu schützen. Dies geschieht indem das Glutathion oxidiert wird, die Elektronen auf die ROS übertragen werden, und zwei Glutathion-Moleküle in ein Dimer Glutathion-Disulfid überführt werden. Die Rückführung in Glutathion ist wiederum NADH-abhängig. Neben der beschriebenen, durch die Glutathionperoxidase katalysierten Reaktion, dient auch das Enzym Katalase dem Schutz vor H_2O_2 , indem es H_2O_2 in Sauerstoff und Wasser umwandelt.

In der Anwesenheit von Eisen, das bei der Lagerung der Erythrozyten aus Hämoglobin bzw. Methämoglobin freigesetzt werden kann, kommt es im Rahmen der Haber Weiss- und Fenton- Reaktionen zur Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Form von Hydroxylradikalen. Diese Radikale können zur Schädigung verschiedener Zellkomponenten führen. (Aubron C, 2013; Bennett-Guerrero E, 2007; D'Alessandro et al., 2015; Hess, 2010)

Inwieweit diese „storage lesions“, und damit das Alter der Erythrozytenkonzentrate, allerdings Einfluss auf den Gesundheitszustand der Patienten nach einer Bluttransfusion haben, ist nach wie vor Gegenstand von Diskussionen. So wurde beobachtet, dass bei herzchirurgischen Patienten, die Transfusionen mit über 14 Tage lang gelagertem Blut erhalten hatten, die Komplikationsrate anstieg und die Überlebensrate sank. (Koch et al., 2008)

Andere Studien jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede im „Multiple Organ Dysfunction Score“ oder der 90-Tages-Sterblichkeit bei Patienten feststellen, die unterschiedlich lange gelagerte Erythrozytenkonzentrate transfundiert bekommen hatten. (Lacroix et al., 2015; Steiner et al., 2015; Voorhuis et al., 2013)

Trotz der noch unklaren Auswirkungen auf Patienten, sind verschieden starke Auswirkungen auf Erythrozyten nach unterschiedlicher Lagerdauer nicht auszuschließen.

Werden Erythrozytenkonzentrate übertragen, muss die Wiederfindungsrate der Erythrozyten (PTR, posttransfusion recovery) 24 Stunden nach der Transfusion bei mindestens 75% liegen. (Bundesärztekammer, 2003)

Eine Studie zeigt, dass sowohl bei länger als auch bei kürzer gelagerten Konzentraten dieser Prozentsatz eingehalten werden konnte, die PTR kürzer gelagerter Konzentrate aber signifikant höher ausfiel. (Luten et al., 2008)

Oftmals werden Erythrozytenkonzentrate bei Operationen benötigt, die auf extrakorporale Zirkulation angewiesen sind. Hierbei beeinflussen weitere Faktoren die Erythrozyten, so beispielsweise die künstlichen Oberflächen der Zirkulationssysteme. Außerdem führen die benötigten Blutpumpen durch die mechanische Beanspruchung der Erythrozyten zu erhöhter Hämolyse. (Sakota et al., 2008)

Das Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, wie sich eine unterschiedliche Lagerungsdauer von Erythrozytenkonzentraten während extrakorporaler Zirkulation auf die Erythrozyten auswirkt. Hierbei wurden die Konzentrate 6, 20 und 34 Tage bei 4°C gelagert, dann erfolgte eine sechsstündige Zirkulation in einer Herz-Lungen-Maschine bei 37°C mit mehreren Probeentnahmen. Aufgrund des auffälligen Anstiegs von Methämoglobin, und der damit verbundenen Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, wurde weiterhin untersucht, ob durch Zugabe von Antioxidantien positive Effekte auf die Erythrozyten erzielt werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsschema

Es wurden insgesamt drei Versuchsreihen durchgeführt. Jede Versuchsreihe beinhaltete eine Lagerung des Erythrozytenkonzentrates für 6, 20 und 34 Tage. Nach Ablauf der jeweiligen Lagerungsdauer wurde am Versuchstag einem Teil des Erythrozytenkonzentrates Desferal® (Novartis Pharma, Basel), Tocopherol und Trolox hinzugefügt, ein anderer Teil blieb unbehandelt. Anschließend erfolgte ein 6-stündiger Durchlauf des aufgeteilten Erythrozytenkonzentrates durch eine Herz- Lungen- Maschine. Während dieser sechs Stunden erfolgten jeweils vier Probenentnahmen. Die erste direkt zu Beginn des Durchlaufs, die zweite nach zwei Stunden, die dritte nach vier Stunden und die vierte nach sechs Stunden zum Ende des Durchlaufs.

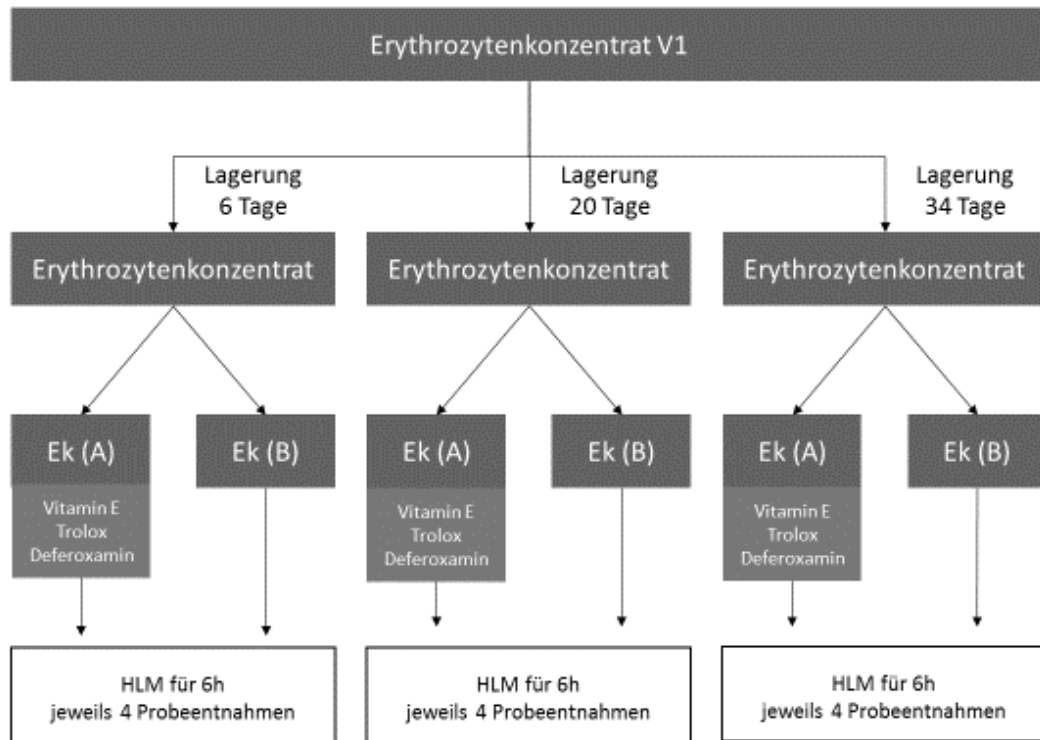


Abbildung 1: Versuchsschema am Beispiel der Versuchsreihe V1

Die Erythrozytenkonzentrate (Ek) wurden nach unterschiedlicher Lagerungsdauer (6, 20, 34 Tage) in Ek mit Zusatz von Vitamin E, Trolox und Deferoxamin (A) und Ek ohne Zusätze (B) aufgeteilt und zirkulierten für 6 Stunden in der Herz-Lungen-Maschine (HLM)

2.2 Material

2.2.1 Erythrozytenkonzentrat

Erythrozytenkonzentrat wird aus Vollblutspenden gewonnen. Die Abnahme des Blutes vom Spender erfolgt in sterile geschlossene Beutelsysteme, die die Herstellung von Erythrozytenkonzentraten ohne Eröffnung des Systems erlauben. Somit werden Kontaminationen der Konserven vermieden. Zunächst wird der Blutbeutel zentrifugiert und das Blut hierdurch in drei Schichten aufgeteilt. Die unterste Schicht bilden die Erythrozyten, in der Mitte befindet sich der sogenannte „Buffy Coat“, bestehend aus Leukozyten und Thrombozyten, und die oberste Schicht letztlich ist das Blutplasma. Im nächsten Schritt werden das Blutplasma und die Erythrozyten in jeweils separate Beutel abgepresst. Der „Buffy Coat“ verbleibt im ursprünglichen Beutel. (Böck, 2019; Lindenau, 1996) Der Beutel für die Erythrozyten enthält hierbei Stabilisatoren, die im Erythrozytenkonzentrat verbleiben. Im Fall der in dieser Studie verwendeten Konzentrate CDP-50-Stabilisator und SASG-Mannitol-Additivlösung. (ZKT, 2006)

Da bei der Separation dennoch Leukozyten im Erythrozytenanteil verbleiben, wird weiterhin eine Leukozytendepletion durchgeführt, um durch Leukozyten ausgelöste unerwünschte Wirkungen auf den Empfänger zu vermeiden. Die Depletion erfolgt durch sogenannte Adhäsionsfiltration. Das Erythrozytenkonzentrat wird über einen Filter aus Polyester oder Polyurethan gefiltert, an dem die Restleukozyten haften bleiben. Das entstandene Erythrozytenkonzentrat enthält dann weniger als 1×10^6 Leukozyten. (Böck, 2019; Walther-Wenke et al., 2001) Das verwendete depletierte Erythrozytenkonzentrat b-EK-Aph/ Tü wird spätestens 14 Tage nach der Blutentnahme mit mindestens 25 Gy bestrahlt. Die Erythrozytenkonzentrate werden anschließend bei 4°C gelagert.

In dieser Studie wurden pro Versuchsreihe ein Erythrozytenkonzentrat verwendet, das aus einer einzelnen Spende gewonnen wurde. Insgesamt kamen demnach Konzentrate von drei verschiedenen Spendern zum Einsatz.

2.2.2 Verwendete Zusätze

Desferal®:

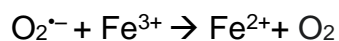
Desferal® enthält den Wirkstoff Deferoxamin. Deferoxamin bildet mit dreiwertigen Eisen- oder Aluminiumionen Chelatkomplexe. Aus diesem Grund wird es bei chronischer Eisenüberladung oder zur Diagnose von Eisen- oder Aluminiumüberladung eingesetzt. Deferoxamin ist in der Lage, freies Eisen zu binden, wohingegen es kein Eisen aus Transferrin, Hämoglobin oder Substanzen, die Hämoglobin enthalten zu entfernen vermag. (Novartis, 2011) Ein Gramm Deferoxamin bindet ungefähr 85 mg Eisen. (Reichl, 2002)

Eisenchelatoren, wie Deferoxamin, schützen Zellen vor den Folgen der Haber-Weiss und Fenton- Reaktionen, bei denen hochreaktive Hydroxylradikale entstehen, die Zellen schädigen können.

Die Haber-Weiss- Reaktion



wird durch Übergangsmetalle wie Eisen katalysiert und unterteilt sich in die Reduktion des Eisens und die Fenton- Reaktion.



Tocopherol:

Tocopherole gehören neben den Tocotrienolen und Tocomonolen zur Gruppe des Vitamins E. Tocopherole sind fettlöslich und fungieren als Antioxidantien. Sie sind in der Lage freie Radikale, die mehrfach ungesättigte Fettsäuren der Zellmembranen und Lipoproteine angreifen, zu neutralisieren. Greifen Hydroxylradikale an einer Doppelbindung einer ungesättigten Fettsäure an, entsteht ein Perhydroxylradikal. Reagiert dieses mit molekularem Sauerstoff, entsteht ein Peroxylradikal. An dieser Stelle kann Tocopherol die Kettenreaktion

unterbrechen, bevor das entstandene Peroxylradikal wiederum mit einer weiteren ungesättigten Fettsäure reagieren kann, indem es als Tocopherol-Hydrochinon mit dem Peroxylradikal reagiert und dabei selbst radikalisiert wird. Das Tocopheryl-Radikal allerdings ist reaktionsträge und wird anschließend durch Vitamin C (Ascorbinsäure) oder Glutathion wieder regeneriert. (Rassow et al., 2012)

Trolox:

Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carbonsäure) ist ein Vitamin-E-Derivat, das, im Gegensatz zu Tocopherol, wasserlöslich ist. (Huang et al., 1996)

2.2.3 Herz-Lungen-Maschine

Der Versuchsaufbau der Herz- Lungen- Maschine bestand aus mehreren Komponenten.

Der verwendete Oxygenator (D 702 MASTERFLO, DIDECO, Mirandola, Italien) ist ein Membran- Oxygenator mit mikroporösen Hohlfasern. Das Gasaustausch- modul dient als Lungenersatz zum Überführen von Sauerstoff und zur Entfernung von Kohlendioxid. Im Oxygenator integriert ist des Weiteren ein Wärmeaustauscher, durch den das Blut während der Zirkulation auf einer konstanten Temperatur gehalten werden kann, indem entsprechend erwärmtes Wasser durch Röhrensysteme im Oxygenator fließt, und dadurch das enthaltene Blut erwärmt. (dideco; Range, 1998)

Zur Erwärmung des Wassers auf 37°C diente ein Temperiergerät (Haake N3).

Am Oxygenator ist außerdem ein Blutreservoir vorhanden.

Um eine gleichmäßige Zirkulation des Blutes durch die Herz- Lungen- Maschine zu gewährleisten, wurden Rollerpumpen (Stöckert, München) verwendet. Hierbei ist das Schlauchsystem halbkreisförmig in der Pumpe angeordnet und zwei rotierende Andruckrollen pressen durch Druck auf den Schlauch das Blut durch das System. Die Blutflussrate wurde, entsprechend dem empfohlenen Maximum für den Oxygenator, konstant auf 2,5 l/min gehalten. Zur Überprüfung wurde ein Ultraschall- Durchflussmesser verwendet (Sono TT, emtec).

Die verwendeten Schläuche sind speziell für blutführende Systeme entwickelt und hämokompatibel (ECC noDOP 3/8"x3/32", Raumedic, Germany).(Raumedic)

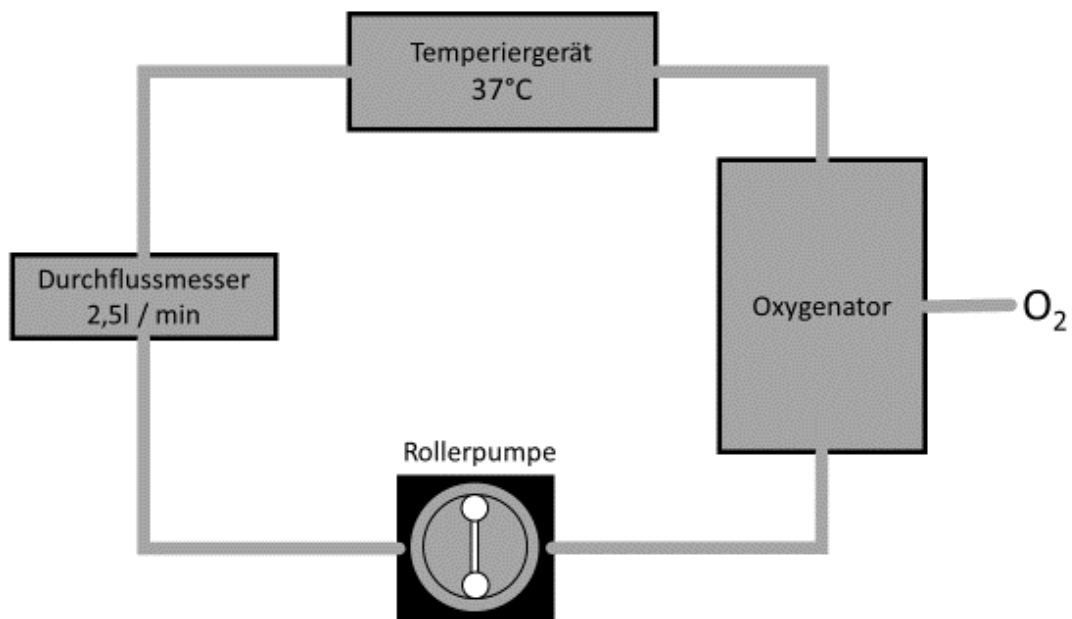


Abbildung 2: Versuchsaufbau der Herz- Lungen- Maschine

Eigene Darstellung, nach (Zimmermann, 2007)

Dem Oxygenator wird Sauerstoff (O₂) zugeführt. Eine Rollerpumpe erhält einen konstanten Blutfluss durch die HLM von 2,5l/min aufrecht; Überprüfung mithilfe eines Durchflussmessers. Ein Temperiergerät hält die Temperatur auf 37°C. HLM: Herz-Lungen-Maschine

2.3 Versuchsablauf und erhobene Parameter

2.3.1 Versuchsablauf

Zu Beginn wurde das Erythrozytenkonzentrat (b-EK-Aph/TÜ, Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin gGmbH, Tübingen) mit 0,9% NaCl auf einen Hämatokrit von 30 verdünnt und in sechs Teile à 400 ml aufgeteilt. Die Konzentrate wurden dann bei 4°C in einer Kühlkammer gelagert.

Zwei der aufgeteilten Erythrozytenkonzentrate wurden nach einer Lagerungsdauer von 6 Tagen verwendet, die übrigen vier Konzentrate nach 20 bzw. 34 Tagen.

Vor Anschluss an die Herz- Lungen- Maschine wurde einem Erythrozytenkonzentrat, A, Desferal (Novartis, Stein, Switzerland) (100mg/400ml), Trolox (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) (20mg/400ml) und Tocopherol (20mg/400ml) zugesetzt, ein Erythrozytenkonzentrat, B, blieb ohne weitere Zusätze.

Beide Erythrozytenkonzentrate wurden jeweils in das Blutreservoir eines Membran- Oxygenators (D 702 MASTERFLO, DIDECO) gefüllt und an die Herz- Lungen- Maschine angeschlossen.

Es erfolgten Probenentnahmen beider Erythrozytenkonzentrate (A und B) zu Beginn des Durchlaufs und nach zwei, vier und sechs Stunden. Es wurde jeweils ein Blutbild (ABX MICROS 60, HORIBA Medical) und eine Blutgasanalyse (cobas b 221, Roche Diagnostics) erstellt. Bei der ersten und letzten Abnahme wurde zusätzlich Erythrozytenkonzentrat zur späteren Bestimmung der osmotischen Resistenz und zur Testung verschiedener Parameter der Eryptose (Physiologisches Institut, Tübingen) entnommen.

Das gleiche Vorgehen erfolgte mit den Erythrozytenkonzentraten nach 20 Tagen Lagerung und den Erythrozytenkonzentraten nach 34 Tagen Lagerung.

2.3.2 Bestimmung des Blutbildes

Das erstellte kleine Blutbild (ABX Micros 60, Horiba Medical) lieferte Werte für den Hämatokrit (HCT), die Anzahl der Erythrozyten, das mittlere Zellvolumen der Erythrozyten (MCV), den mittleren korpuskulären Hämoglobingehalt (MCH), die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC), die Erythrozytenvolumenverteilung und die Hämoglobinkonzentration.

Weiterhin die Anzahl der Leukozyten und der Thrombozyten, den Thrombokrit (Hämatokrit der Thrombozyten), das durchschnittliche korpuskuläre Thrombozytenvolumen und die Thrombozytenvolumenverteilung.

2.3.3 Blutgasanalyse

Die Blutgasanalyse erfolgte mittels des cobas b 221 Systems (Roche). Es wurde neben dem pH- Wert der CO₂- Partialdruck und der O₂- Partialdruck bestimmt. Des Weiteren wurden bei der durchgeführten Analyse das Gesamthämoglobin und die Sauerstoffsättigung gemessen. Die Anteile von O₂Hb (Oxyhämoglobin, oxygeniertes Hämoglobin), COHb (Carboxyhämoglobin), HHb (desoxygeniertes Hämoglobin) und MetHb (oxidiertes Hämoglobin) am Gesamthämoglobin wurde prozentual bestimmt.

2.3.4 Bestimmung der osmotischen Resistenz

Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe aus Isoton II Diluent (Beckman Coulter, bestehend aus 7,9 g/l NaCl, 1,9 g/l di-Na-Hydrogen-Phosphat, 0,4 g/l EDTA Dinatriumsalz, 0,4 g/l KCl, 0,2 g/l Na-dihydrogenphosphat, 0,3 g/l Na-fluorid), und Aquadest hergestellt.

Tabelle 1: NaCl- Konzentrationen der Verdünnungsreihe zur Testung der osmotischen Resistenz

Verdünnung	% NaCl
1	0,00
2	0,12
3	0,20
4	0,24
5	0,28
6	0,32
7	0,36
8	0,40
9	0,44
10	0,48
11	0,52
12	0,56

Zu je 2ml der Verdünnungen 1- 12 wurden 50µl Erythrozytenkonzentrat gegeben. Die Lösungen wurden daraufhin zwei Mal 30 Minuten (erneutes Vermischen nach den ersten 30 Minuten) bei 37°C im Wasserbad inkubiert, um die enthaltenen Erythrozyten zur Hämolyse zu bringen.

Anschließend wurden die Lösungen bei 100g für 10 Minuten zentrifugiert. Hierbei wurden die noch intakten Erythrozyten abzentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abpipettiert und eingefroren.

Die nun im Überstand enthaltene Hämoglobinkonzentration entspricht der Anzahl der hämolysierten Erythrozyten.

Die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration erfolgte nach der Hämiglobincyanid-Methode. Zu 100µl des wieder aufgetauten Überstandes wurden 1ml Isoton II Diluent (Beckman Coulter) und 10µl Zap-oglobin II Lytic Reagent (Beckman Coulter) gegeben und vermischt.

Hierbei wird das Hämoglobin zunächst zu Methämoglobin (Hämiglobin) oxidiert und anschließend durch Kaliumcyanid in Hämiglobincyanid überführt. (Gressner and Arndt, 2013) Neben Hämoglobin und Methämoglobin werden auch Oxyhämoglobin und CO-Hämoglobin in Hämiglobincyanid überführt und damit erfasst.

Die Messung der Extinktion des entstandenen Hämiglobincyanids (CN-Hb) erfolgte im Photometer bei einer Wellenlänge von 546nm gegen Aquadest.

Bei der Auswertung ist bei den Proben mit Verdünnung 1 (reines Aquadest.) von vollständiger Hämolysen ausgegangen worden. Der Hämolysengrad der verschiedenen Lösungen wurde in % der vollständigen Hämolysen angegeben.

Die grafische Ermittlung der Verdünnung bei der 50% Hämolysen vorlag, erfolgte mittels Excel. Dieser Wert fungierte als Vergleichswert.

Eine Rechtsverschiebung der Kurve (zu höheren NaCl-Konzentrationen) bedeutet also eine verminderte osmotische Resistenz, eine Linksverschiebung entsprechend, eine Erhöhung der osmotischen Resistenz.

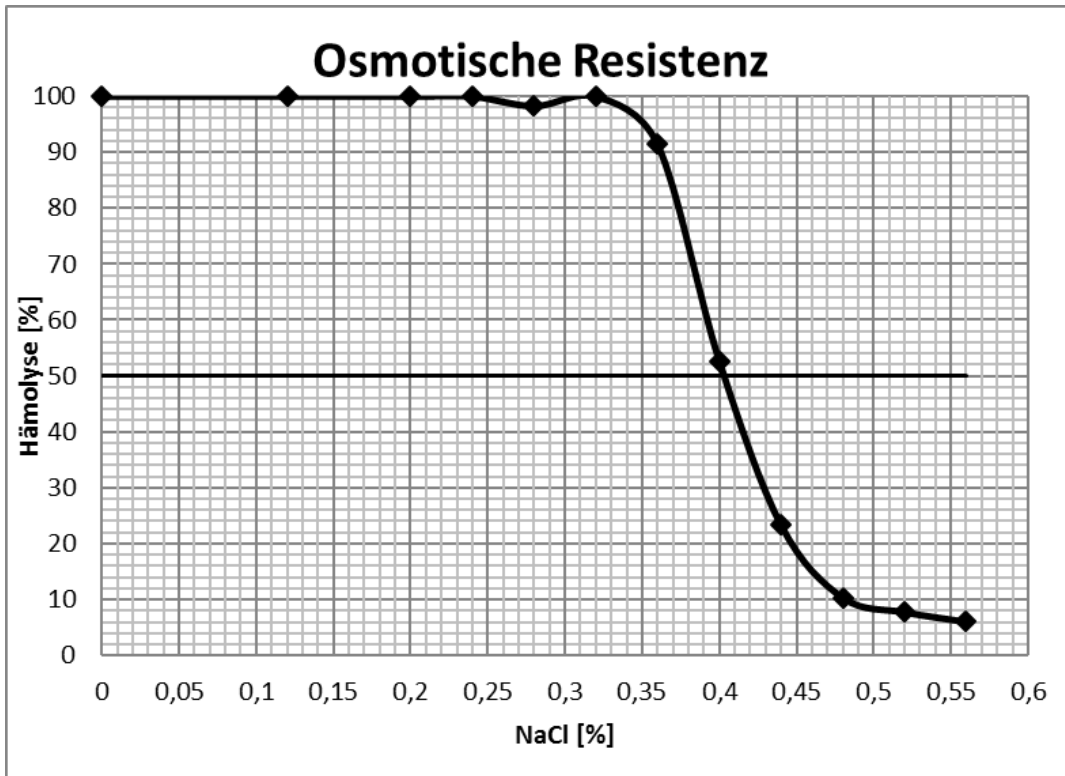


Abbildung 3: Beispiel für die graphische Ermittlung der NaCl- Konzentration der 50%igen Hämolyse

Die Konzentration des NaCl (x-Achse) aufgetragen gegen den ermittelten Hämolysegrad (y-Achse). Der Schnittpunkt der Kurve bei der 50%igen Hämolyse vorliegt, ergibt die gesuchte NaCl-Konzentration.

NaCl: Natriumchlorid

2.3.5 Parameter der Eryptose

Alle Daten, die Parameter der Eryptose betreffend, wurden von Dr. Nazneen Shaik und ihrem Team am Physiologischen Institut Tübingen I erhoben und mir vollständig zur Auswertung zur Verfügung gestellt.

2.3.5.1 Bestimmung des Zellvolumens

Das Zellvolumen wurde mithilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Hierbei werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laserstrahl definierter Wellenlänge vorbeigeführt, indem sie hintereinander durch eine Kapillare geschleust werden. Das beim Auftreffen des Lasers auf eine Zelle entstehende Streulicht wird von Photodetektoren registriert. Bei einer Abweichung des Streulichts von maximal 10° erhält man den sogenannten Forward Scatter (FSC), der Informationen über die Größe der Zelle angibt. Je kleiner das Vorwärtsstreusignal, desto kleiner ist die Zelle. (Fischer, 2016; Hermle, 2007; Meier, 2013)

2.3.5.2 Bestimmung der Phosphatidylserinexposition

Die Phosphatidylserinexposition wird mithilfe von Annexin-V, einem calciumabhängigen phospholipidbindenden Protein, das eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin hat, bestimmt. Auch hier kam die Durchflusszytometrie, bzw. FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) zum Einsatz.

Um die Bindung von Annexin-V an Phosphatidylserin zu gewährleisten, wurde die erforderliche Calciumkonzentration durch Verwendung eines Annexin-Bindepuffers erreicht. Das Annexin-V wird vor der Messung mit dem Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt. Fluorochrome können Lichtenergie absorbieren und die Elektronen nutzen die Energie, um auf ein höheres Energieniveau zu gelangen. Beim Zurückfallen auf das ursprüngliche Niveau wird Licht einer anderen Wellenlänge emittiert, das von Detektoren erfasst und somit gemessen werden kann. (Fischer, 2016; Hermle, 2007; Meier, 2013)

2.3.5.3 Bestimmung des intrazellulären Calciumspiegels

Der intrazelluläre Calciumspiegel kann mithilfe von Fluo-3 AM Ester bestimmt werden.

Damit nur die aufgrund des intrazellulären Calciums entstehende Fluoreszenz gemessen wird, wird das Fluo-3 mit einer Acetoxymethyl-Gruppe verestert. Das entstandene Fluo-3 AM (Acetoxymethyl-) Ester ($C_{51}H_{50}Cl_2N_2O_{23}$) bindet kein Calcium, ist aber membrangängig und gelangt so in die Zelle. Dort enthaltene Esterasen spalten den AM-Rest anschließend wieder ab. Das Fluo-3 ist dann in der Lage mit dem intrazellulären Calcium einen Chelatkomplex zu bilden, kann aber nicht die Membran passieren, womit der Farbstoff also nur intrazellulär wirksam wird. Die Komplexbildung lässt das Fluo-3 mit vierzigfacher Intensität fluoreszieren, was mithilfe der FACS-Analyse detektiert werden kann. (Fischer, 2016; Hermle, 2007; Meier, 2013)

2.4 Auswertung

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mittels Microsoft Excel. Die Erstellung der Schaubilder wurde mittels Microsoft Excel und PowerPoint durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Erythrozytenparameter (Blutbild)

Keiner der im kleinen Blutbild enthaltenen Erythrozytenparameter zeigte während des zwei- bis sechsständigen Durchlaufs durch die Herz-Lungen-Maschine signifikante Veränderungen. Sowohl das MCV, das MCH als auch die MCHC blieben im Normalbereich. Der Hämatokrit wich in den Messungen nur unwesentlich vom, vorher durch Verdünnung mit 0,9% NaCl, eingestellten Wert von 30 ab.

3.2 pH-Wert der Erythrozytenkonzentrate

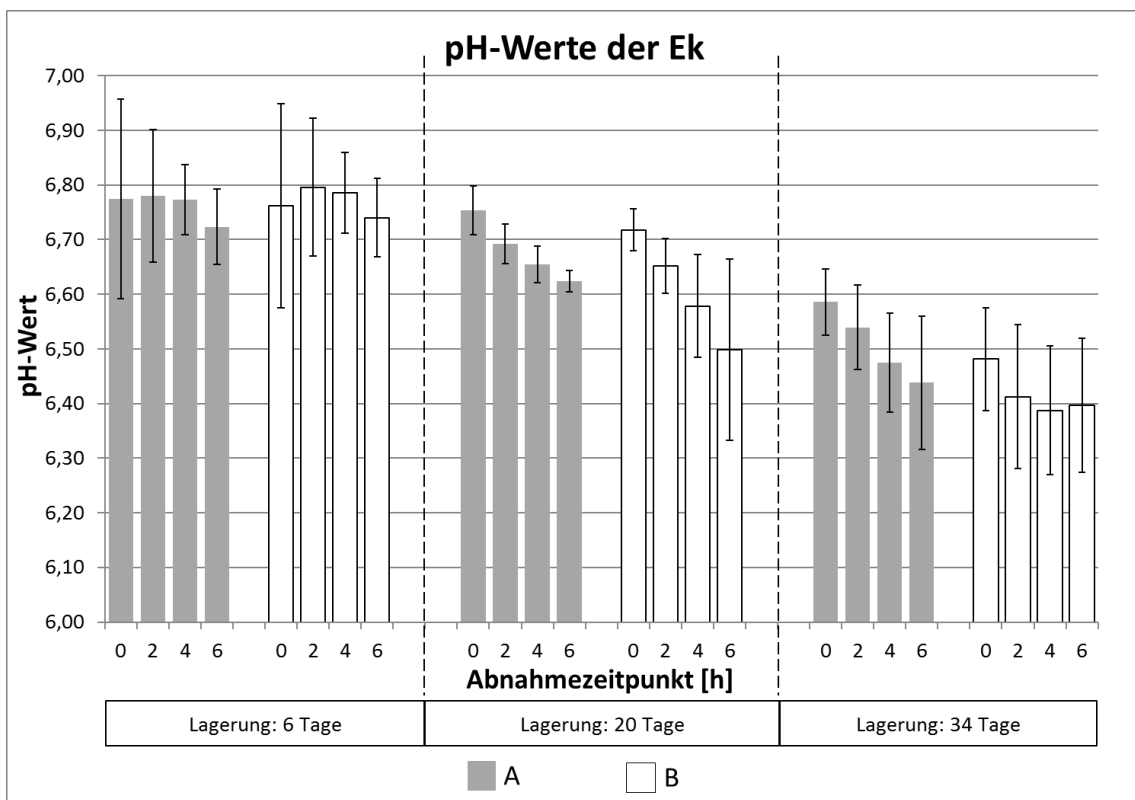


Abbildung 4: pH-Werte der Erythrozytenkonzentrate

nach Lagerung von 6, 20, und 34 Tagen zu den Abnahmezeiten 0, 2, 4 und 6 Stunden während Zirkulation in der HLM. Mit Zusatz von Vitamin E, Trolox und Desferal (A) und ohne Zusätze (B). Die Daten sind als Mittelwerte der 3 Versuchsreihen \pm Standardabweichung dargestellt. Ek: Erythrozytenkonzentrate, HLM: Herz- Lungen- Maschine

Der Ausgangs-pH-Wert der Proben vor Durchlauf durch die HLM sank, wie in Abbildung 4 dargestellt, mit längerer Lagerdauer der Erythrozytenkonzentrate immer mehr ab. Bei nur 6 Tage gelagertem Blut waren innerhalb der 6 Stunden Zirkulation in der HLM kaum Veränderungen des pH-Werts feststellbar, während bei zuvor länger gelagerten Konserven (20 bzw. 34 Tage) der pH- Wert auch während des Durchlaufs weiter absank. Diese Beobachtungen treffen sowohl für die unbehandelten als auch für die vorher mit Desferal, Tocopherol und Trolox versetzten Proben zu.

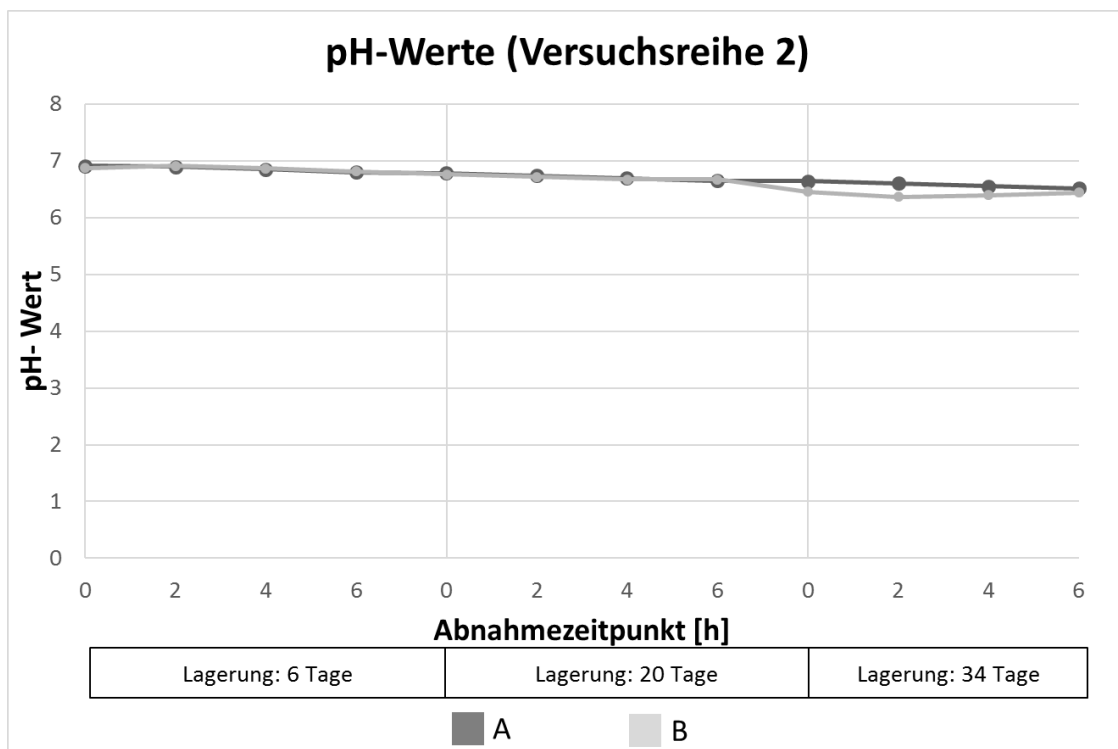


Abbildung 5: pH- Werte (Versuchsreihe 2)

nach Lagerung des Ek von 6, 20, und 34 Tagen zu den Abnahmezeiten 0, 2, 4 und 6 Stunden während Zirkulation in der HLM. Mit Zusatz von Vitamin E, Trolox und Desferal (A) und ohne Zusätze (B). Ek: Erythrozytenkonzentrate, HLM: Herz-Lungen- Maschine

In Abbildung 5 ist die zweite Versuchsreihe einzeln dargestellt, also die Werte eines Erythrozytenkonzentrates, das von einem einzelnen Spender stammt und anschließend verdünnt, aufgeteilt und gelagert wurde (vgl. 2.1. Versuchsschema). Betrachtet man nur diese Reihe, so ist deutlich ersichtlich, dass sich

hier der pH- Wert, sowohl ohne als auch mit Zusätzen, während der Zirkulation kaum verändert. Auch die Lagerungsdauer nimmt in dieser Versuchsreihe keinen Einfluss auf den pH-Wert.

3.3 Sauerstoffsättigung der Erythrozytenkonzentrate

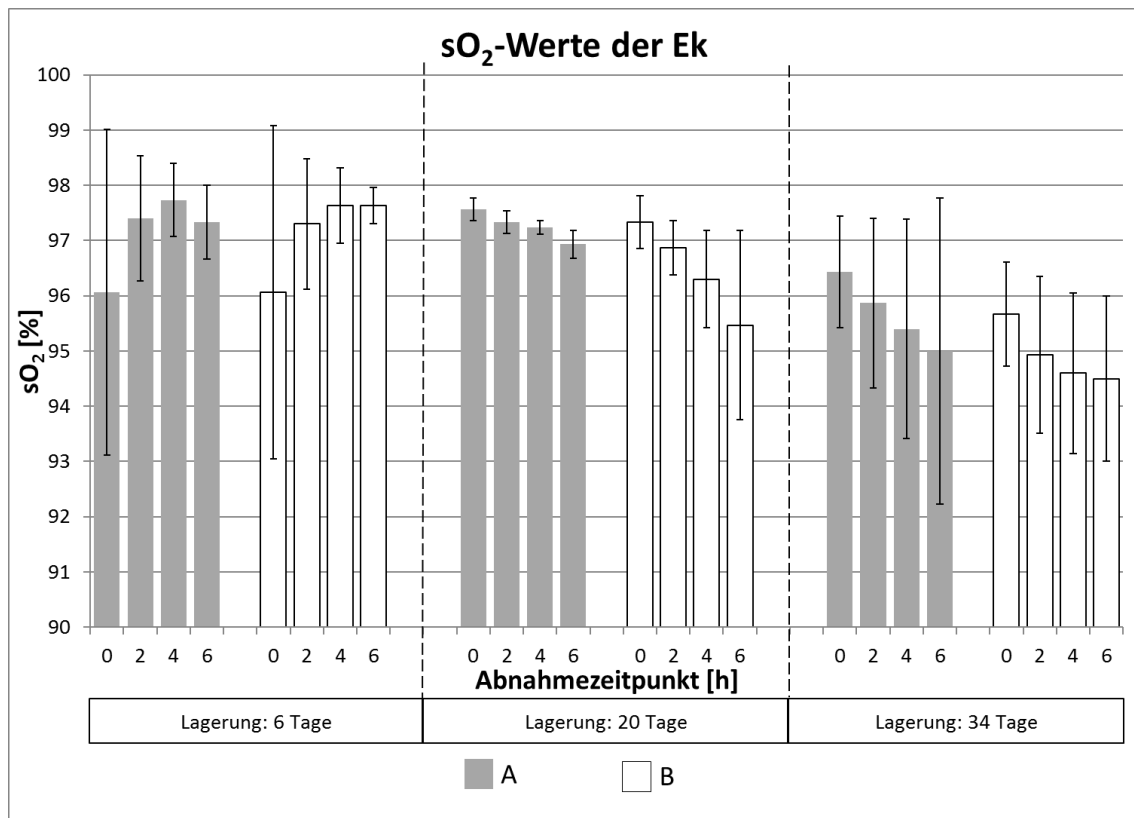


Abbildung 6: Sauerstoffsättigung der Erythrozytenkonzentrate

nach Lagerung von 6, 20, und 34 Tagen zu den Abnahmezeiten 0, 2, 4 und 6 Stunden während Zirkulation in der HLM. Mit Zusatz von Vitamin E, Trolox und Desferal (A) und ohne Zusätze (B). Die Daten sind als Mittelwerte der 3 Versuchsreihen \pm Standardabweichung dargestellt. Ek: Erythrozytenkonzentrate, HLM: Herz- Lungen- Maschine, sO₂: Sauerstoffsättigung

Die Sauerstoffsättigung der Erythrozytenkonzentrate zeigte, den Beobachtungen beim pH-Wert entsprechend, nach einer Lagerungsdauer von 20 und 34 Tagen während der Zirkulation in der HLM über 6 Stunden einen kontinuierlichen Abfall,

wie in Abbildung 6 ersichtlich ist. Unterschiede zwischen Konzentraten mit bzw. ohne Zusätze konnten nicht ausgemacht werden. Die Sauerstoffsättigung der Erythrozyten nahm also bei sinkendem pH-Wert ab.

3.4 Methämoglobinanteil der Erythrozyten

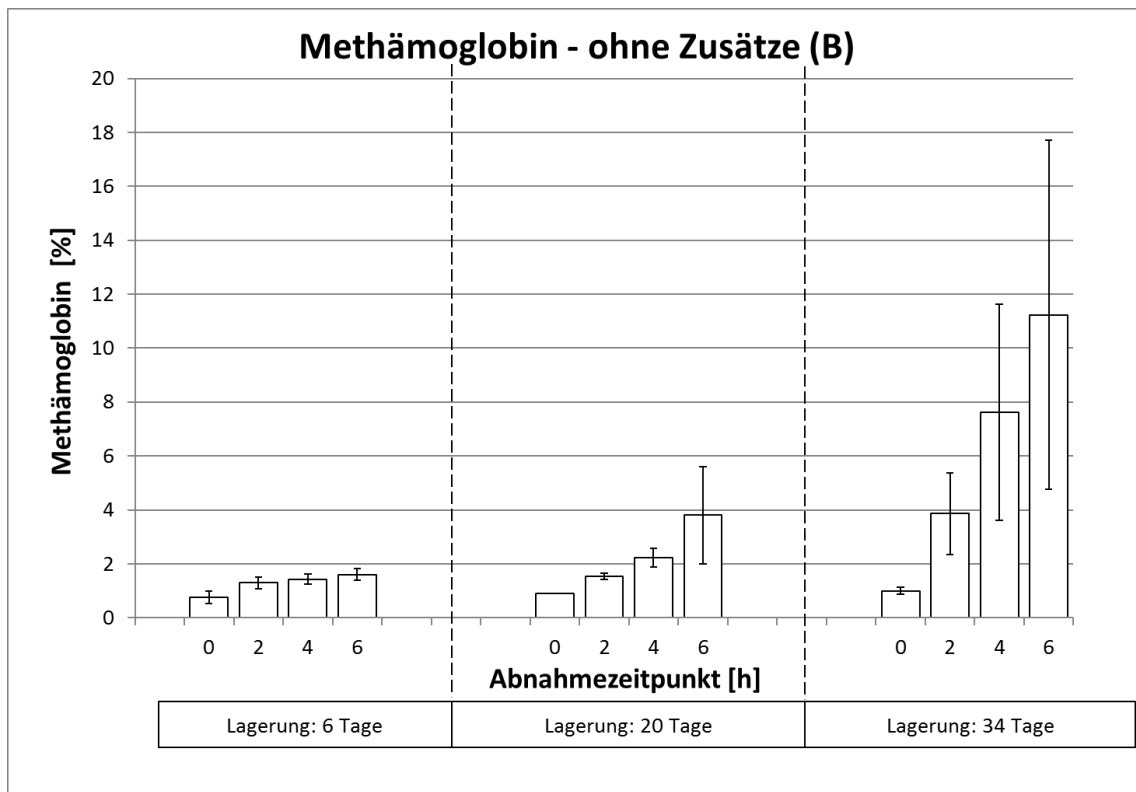


Abbildung 7: Methämoglobinanteil der Ek ohne Zusätze

nach Lagerung von 6, 20, und 34 Tagen zu den Abnahmezeiten 0, 2, 4 und 6 Stunden während Zirkulation in der HLM. Die Daten sind als Mittelwerte der 3 Versuchsreihen \pm Standardabweichung dargestellt. Ek: Erythrozytenkonzentrate, HLM: Herz- Lungen- Maschine

Wie Abbildung 7 zeigt, unterscheiden sich die Ausgangswerte des MetHb- Anteils vor Zirkulation in der HLM kaum. So lag der MetHb- Anteil bei 6 Tage gelagertem Blut bei durchschnittlich 0,77%, bei 20 Tage gelagertem Blut bei 0,9%, und bei 34 Tage aufbewahrtm Blut bei 1%. Weiterhin zeigt sich, dass der MetHb-Anteil desto schneller und stärker bei Zirkulation in der HLM anstieg, je länger das Blut

zuvor bei 4°C aufbewahrt worden war. So lag der Anteil bei 20 Tage altem Blut nach 6 Stunden Zirkulation bei 3,8%. Dieser Wert wurde bei 34 Tage gelagertem Blut schon nach 2 Stunden Zirkulation erreicht (3,87%) und stieg im Mittel bis auf 11,23% nach 6 Stunden.

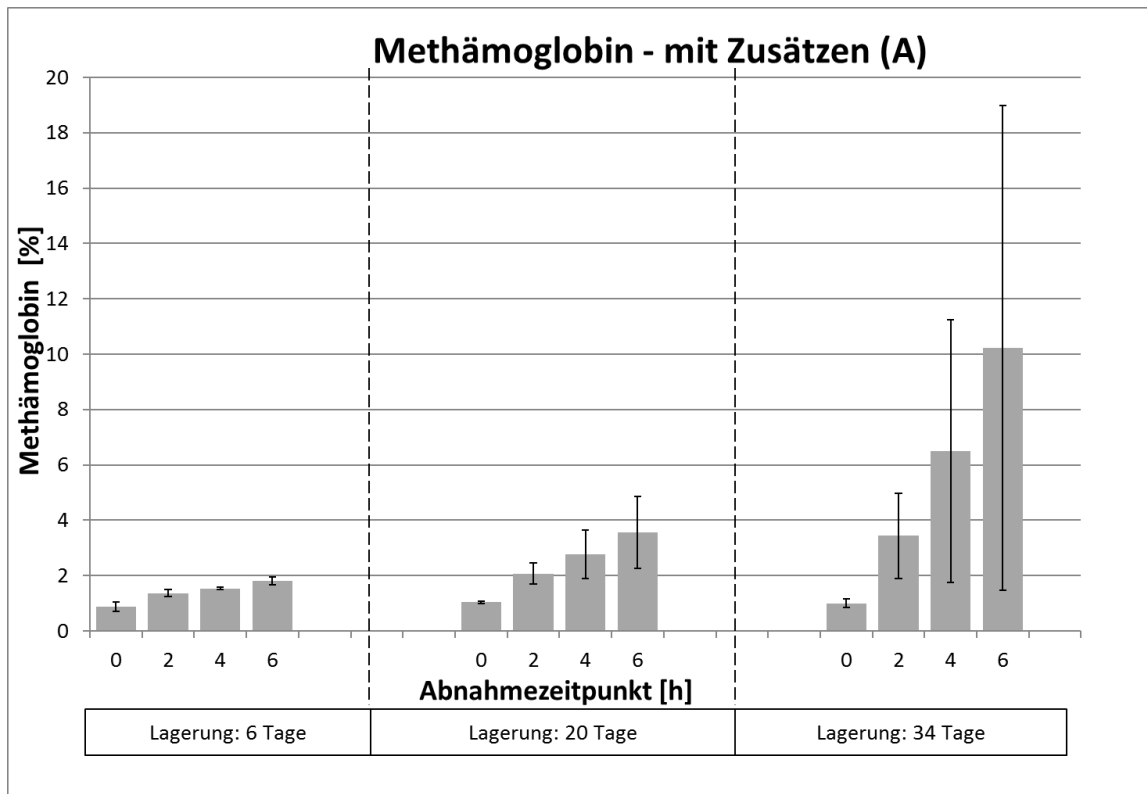


Abbildung 8: Methämoglobinanteil der Ek mit den Zusätzen Vitamin E, Trolox und Desferal

nach Lagerung von 6, 20, und 34 Tagen zu den Abnahmezeiten 0, 2, 4 und 6 Stunden während Zirkulation in der HLM. Die Daten sind als Mittelwerte der 3 Versuchsreihen \pm Standardabweichung dargestellt. Ek: Erythrozytenkonzentrate, HLM: Herz- Lungen- Maschine

Bei den zeitgleich durchgeführten Durchläufen der Proben mit Zusatz von Desferal, Tocopherol und Trolox zeigten sich diese Effekte, wie in Abbildung 8 dargestellt, ebenso. Während der Ausgangsanteil des MethHb zwischen 0,8% und 1,03% lag, stieg der Anteil umso stärker, je länger die Konzentrate zuvor bei 4°C gelagert worden waren. Auch bei den, mit den o.g. Zusätzen versetzten Konzentraten lag der durchschnittliche Anteil nach 6 Stunden Durchlauf bei 3,57% (20 Tage Lagerung) bzw. 10,23% (34 Tage Lagerung).

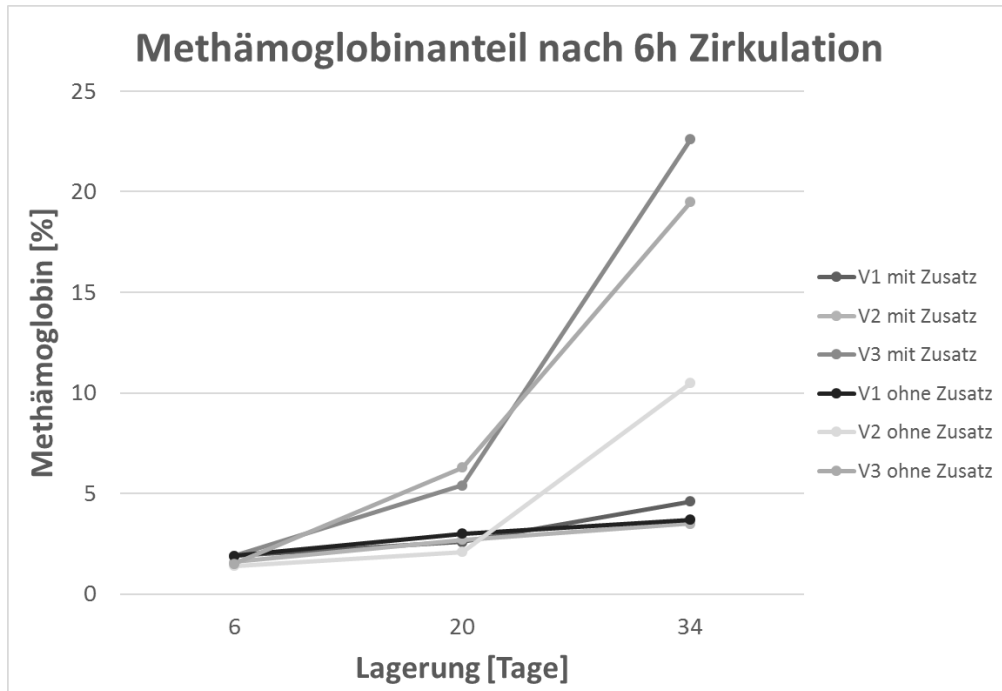


Abbildung 9: Methämoglobinanteil von drei Eks nach 6h Zirkulation in der HLM und vorhergehender Lagerung von 6, 20, und 34 Tagen. Die Versuchsreihen sind einzeln dargestellt. Ek: Erythrozytenkonzentrate, HLM: Herz- Lungen- Maschine

Betrachtet man die drei Versuchsreihen einzeln, so zeigen sich auch hier die Anstiege des MetHb-Anteils, es wird allerdings auch deutlich, dass zwischen den einzelnen Erythrozytenkonzentraten starke individuelle Unterschiede vorhanden sind. Wie in Abbildung 9 gezeigt, ist in Versuchsreihe drei der Anstieg des MetHb, sowohl mit Zusätzen als auch ohne, deutlich größer als in Versuchsreihe eins und zwei. In Versuchsreihe zwei zeigt sich nach 34-tägiger Lagerung nach sechs Stunden Zirkulation ein deutlicher Unterschied zwischen dem Konzentrat ohne Zusätze (10,5%) und dem Konzentrat mit Zusätzen (3,5%), während in Versuchsreihe eins kein bemerkenswerter Unterschied ausmachbar ist. Auch in der dritten Versuchsreihe ist kein nennenswerter Unterschied zwischen Konzentraten mit und ohne Zusätze ausmachbar, die Methämoglobinwerte liegen aber deutlich höher (19,5% ohne Zusätze bzw. 22,6% mit Zusätzen).

3.5 Osmotische Resistenz

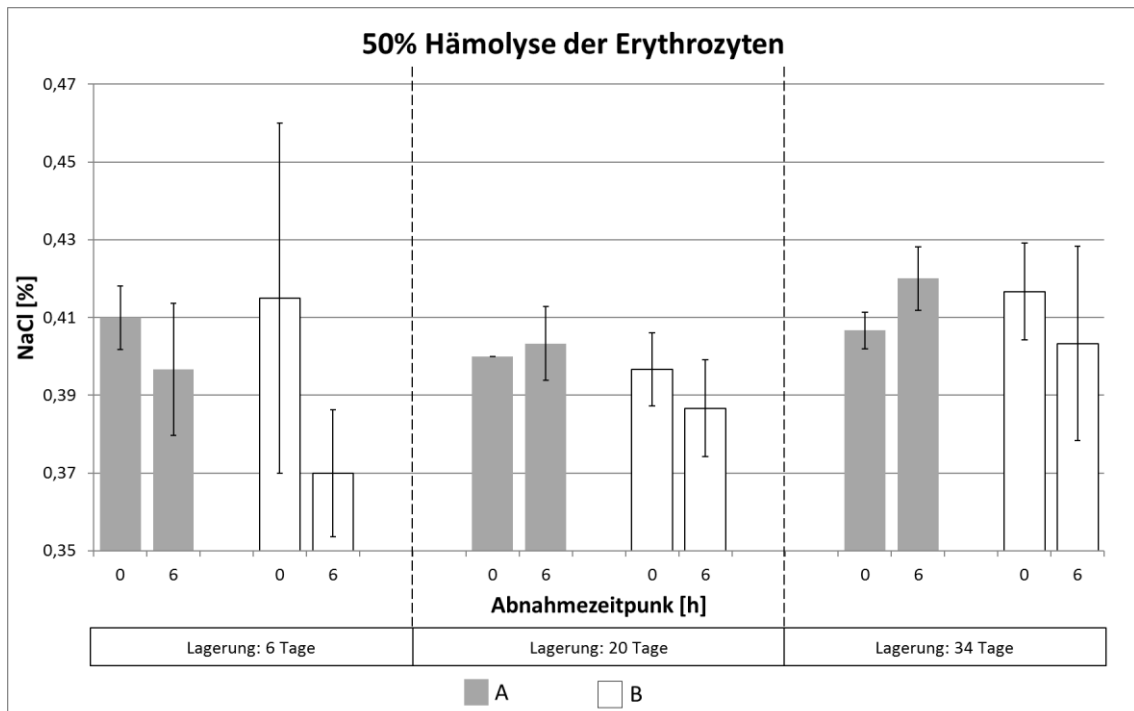


Abbildung 10: NaCl- Konzentration der 50%igen Hämolyse der Erythrozyten

nach Lagerung von 6, 20, und 34 Tagen zu den Abnahmezeiten 0 und 6 Stunden während Zirkulation in der HLM. Mit Zusatz von Vitamin E, Trolox und Desferal (A) und ohne Zusätze (B). Die Daten sind als Mittelwerte der 3 Versuchsreihen \pm Standardabweichung dargestellt. Ek: Erythrozytenkonzentrate, HLM: Herz- Lungen- Maschine

Die Auswertung der osmotischen Resistenz der Erythrozyten jeweils vor Beginn und zum Ende der Zirkulation durch die HLM ergab im Mittel der drei Versuchsreihen, wie in Abbildung 10 gezeigt, Werte zwischen einer 0,37%igen NaCl- und einer 0,42%igen NaCl- Lösung für die Hämolyse von 50% der Erythrozyten. Hämolyse beginnt im Normalfall bei einer NaCl- Konzentration von 0,46-0,42%, bei einer Konzentration von 0,34- 0,30% sind meist alle Erythrozyten hämolysiert. Die Ergebnisse bewegen sich demzufolge alle im tolerierbaren Bereich.

3.6 Parameter der Eryptose

3.6.1 Zellvolumen

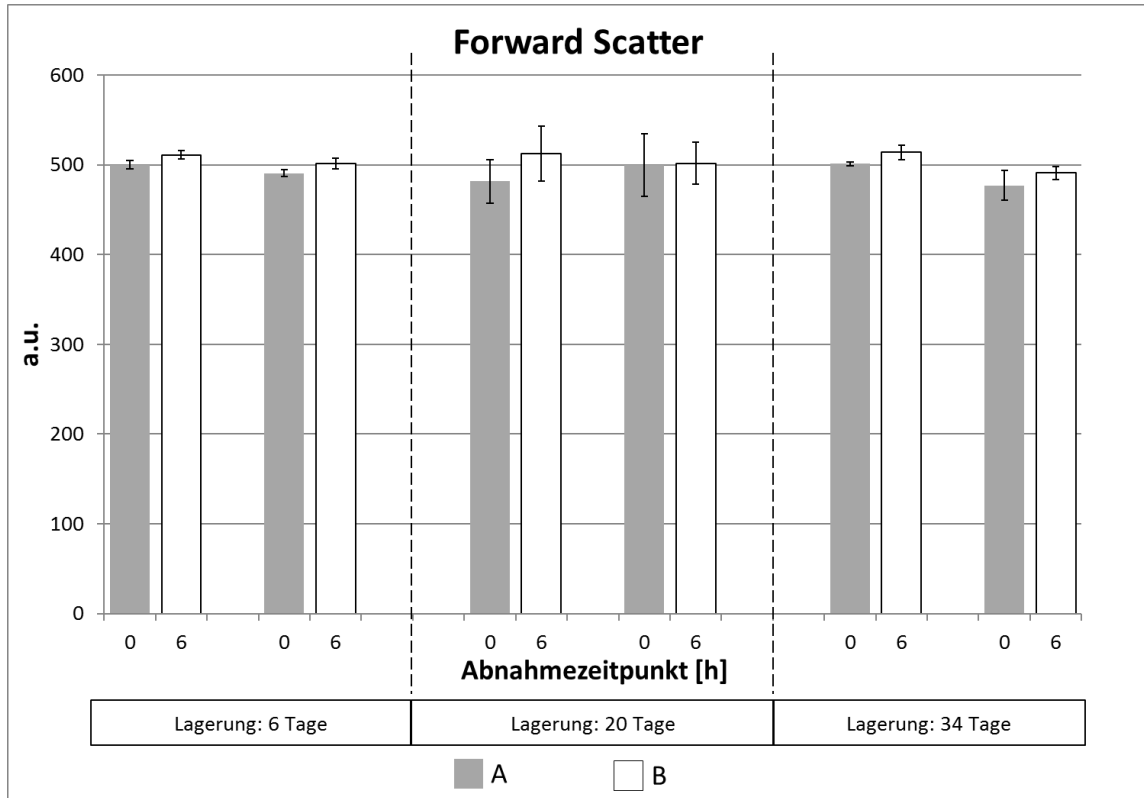


Abbildung 11: Forward Scatter der Erythrozyten

nach Lagerung von 6, 20, und 34 Tagen zu den Abnahmezeiten 0 und 6 Stunden während Zirkulation in der HLM. Mit Zusatz von Vitamin E, Trolox und Desferal (A) und ohne Zusätze (B). Die Daten sind als Mittelwerte der 3 Versuchsreihen \pm Standardabweichung dargestellt. Ek: Erythrozytenkonzentrate, HLM: Herz- Lungen- Maschine, a.u.: arbitrary units (willkürliche Einheit)

Abbildung 11 veranschaulicht die Ergebnisse der Messung des Forward Scatters. Dieser, mithilfe der Durchflusszytometrie bestimmte Wert liefert Informationen über die Größe der Zelle. Je kleiner das Vorwärtsstreusignal, desto kleiner ist die Zelle. Es ist dargestellt, dass sich bei der Messung des Forward Scatters im Vergleich der Proben ohne vorherige Zirkulation in der HLM und nach sechs Stunden Zirkulation keine Unterschiede zeigten, sowohl mit Zusatz von Desferal, Tocopherol und Trolox, als auch ohne. Auch die unterschiedliche Lagerungsdauer der Erythrozytenkonzentrate zeigte keine Auswirkungen.

3.6.2 Phosphatidylserinexposition

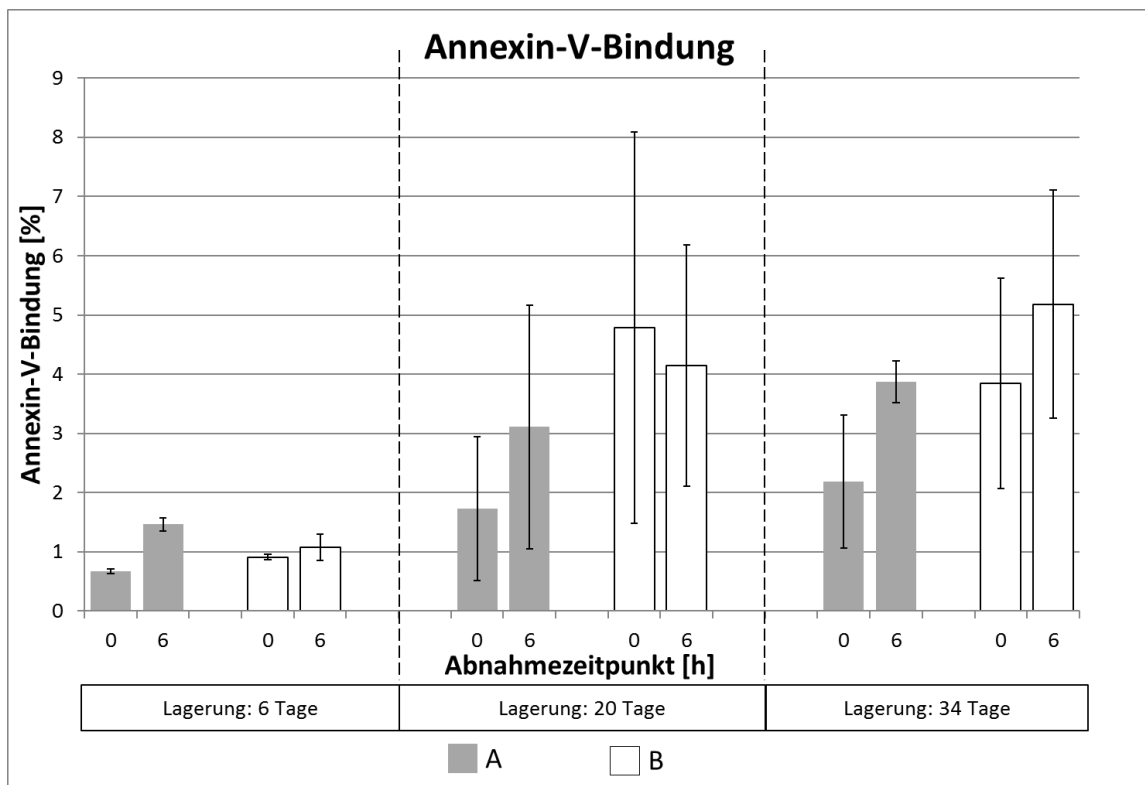


Abbildung 12: Annexin-V-Bindung der Erythrozyten

nach Lagerung von 6, 20, und 34 Tagen zu den Abnahmezeiten 0 und 6 Stunden während Zirkulation in der HLM. Mit Zusatz von Vitamin E, Trolox und Desferal (A) und ohne Zusätze (B). Die Daten sind als Mittelwerte der 3 Versuchsreihen \pm Standardabweichung dargestellt. Ek: Erythrozytenkonzentrate, HLM: Herz- Lungen- Maschine

Bei frischem Blut zeigte sich sowohl vor der Zirkulation als auch nach sechs Stunden bei allen Proben eine gleichmäßige Phosphatidylserinexposition zwischen 0,7 und 1,5% der Erythrozyten, wie in Abbildung 12 dargestellt ist. Weiterhin ist zu sehen, dass nach einer Lagerungsdauer von 20 bzw. 34 Tagen die Proben im Mittel schon vor dem Durchlauf durch die HLM eine deutlich größere Phosphatidylserinexposition aufwiesen, die Proben ohne Zusätze noch in etwas höherem Maße (1,7% bzw. ohne Zusätze 4,8% nach 20 Tagen und 2,2% bzw. ohne Zusätze 3,8% nach 34 Tagen). Bei 34 Tage gelagertem Blut, das sechs Stunden in der HLM zirkuliert hatte, exponierten im Mittel der drei Versuchsreihen 5,2% der Erythrozyten Phosphatidylserin.

3.6.3 Intrazellulärer Calciumspiegel

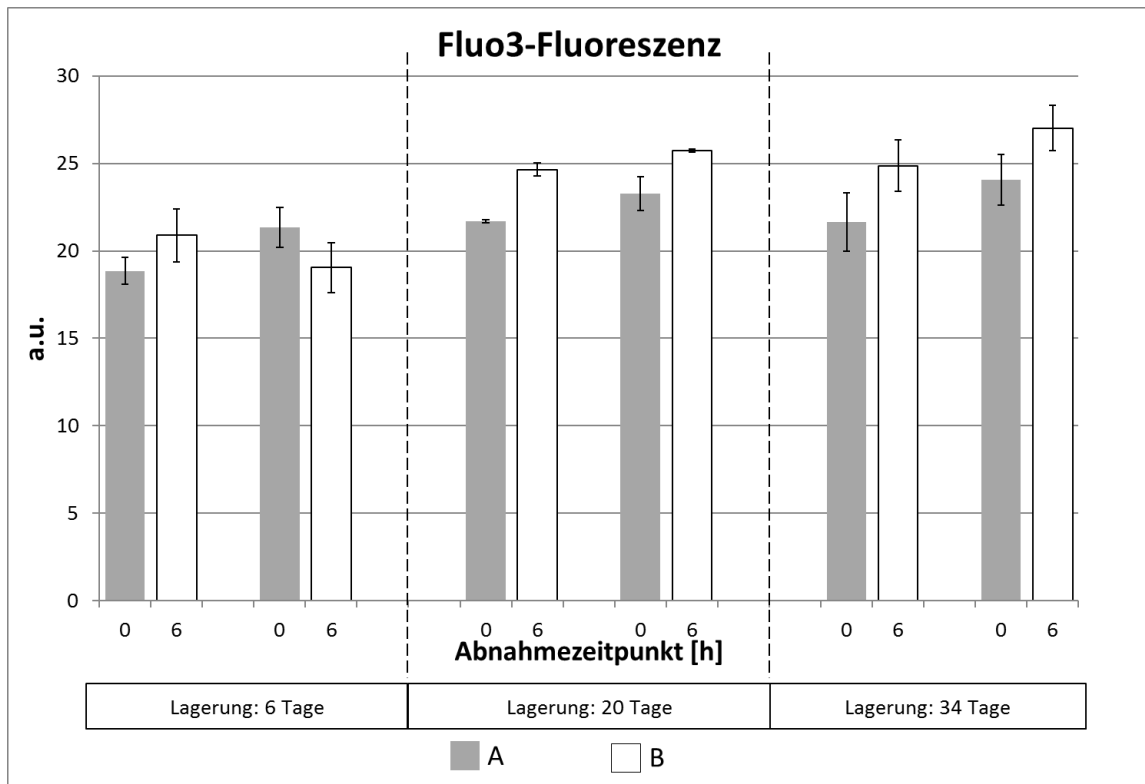


Abbildung 13: Fluo3- Fluoreszenz der Erythrozyten

nach Lagerung von 6, 20, und 34 Tagen zu den Abnahmezeiten 0 und 6 Stunden während Zirkulation in der HLM. Mit Zusatz von Vitamin E, Trolox und Desferal (A) und ohne Zusätze (B). Die Daten sind als Mittelwerte der 3 Versuchsserien \pm Standardabweichung dargestellt. Ek: Erythrozytenkonzentrate, HLM: Herz- Lungen- Maschine, a.u.: arbitrary units (willkürliche Einheit)

Bei der Messung des intrazellulären Calciumlevels mithilfe der Fluo-3 Fluoreszenz zeigt sich bei 20 und 34 Tage gelagertem Blut, wie in Abbildung 13 dargestellt, eine leichte Zunahme des intrazellulären Calciumlevels nach sechs Stunden Zirkulation der Erythrozytenkonzentrate in der HLM.

4 Diskussion

Der verwendete Versuchsaufbau der Herz-Lungen-Maschine ist ein etablierter und am Institut für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Universität Tübingen regelmäßig eingesetzter Aufbau, um Hämokompatibilitätsstudien durchzuführen. (Wendel HP, 1994), (Zimmermann, 2007)

Die in dieser Arbeit verwendete Versuchsdauer von 6 Stunden ist eine realistische Zeitspanne für Operationen, die mit Unterstützung einer Herz-Lungen-Maschine durchgeführt werden. (Lange, 2012)

Die Lagerung von Erythrozytenkonzentraten muss, laut Leitlinien, wie in unserer Studie berücksichtigt, bei 4°C erfolgen. (Bundesärztekammer, 2003)

Der, bei einer Transfusion für die Erythrozyten zu überwindende Temperaturunterschied, die zusätzliche Verwendung von extrakorporaler Zirkulation, und der damit verbundene mechanische Stress, stellen für die Erythrozyten eine außergewöhnliche Belastung dar.

Eine Studie untersuchte die Auswirkungen von Pumpen, die zur Aufrechterhaltung des konstanten Blutflusses benötigt werden. Zum einen wurde zunächst eine erhöhte Hämolyse, vor allem von älteren Erythrozyten mit hohem Hämoglobinanteil, beobachtet. Außerdem konnte ein Rückgang des intrazellulären Hämoglobins beobachtet werden. Dieser subhämolytische Effekt kann auf Veränderungen der Membran, wie verminderte Verformbarkeit und entstehende Undichtigkeiten, zurückgeführt werden. (Sakota et al., 2008)

Es ist daher sinnvoll zu untersuchen, wie sich Lagerungsdauer und zusätzlich der Einfluss extrakorporaler Zirkulation auf die Erythrozyten auswirken.

Der Versuchsaufbau kann natürlich nicht die Einflussfaktoren erfassen, die der Körper eines Patienten, der extrakorporale Zirkulation benötigt, einbringt. So wird das Blut nur über künstliche Oberflächen geleitet, während im Körper beispielsweise das Endothel zur Regulation des Blutflusses und des Stoffaustauschs

dient. Im menschlichen Körper sorgen außerdem die verschiedenen Puffersysteme für eine Aufrechterhaltung des pH- Wertes. Das Ausschließen der körpereigenen Regulationsmechanismen birgt aber auch den Vorteil, dass die Effekte, die eine extrakorporale Zirkulation auslöst, unverfälscht erfasst werden können. So verzichteten wir auch auf die Zugabe von zusätzlichen Puffern, um die Auswirkungen auf den pH- Wert zu beobachten.

Der auffälligste Befund dieser Arbeit war, dass es, in Abhängigkeit von der vorherigen Lagerungszeit der Erythrozyten, zu einem kontinuierlichen Anstieg der Methämoglobinkonzentration während der sechsständigen Zirkulation in der HLM kam. Deshalb soll hierauf im Folgenden näher eingegangen werden.

Die Bildung von Methämoglobin steht im Zusammenhang mit der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies.

Tabelle 2: Übersicht ausgewählter reaktiver Sauerstoffspezies mit Summenformeln

Reaktive Sauerstoffspezies	Formel
Hyperoxid- Anion (Superoxid- Anion)	$O_2^{\bullet -}$
Hydroxylradikal	HO^{\bullet}
Peroxyradikal	ROO^{\bullet}
Hydroperoxyradikal	HO_2^{\bullet}
Wasserstoffperoxid	H_2O_2

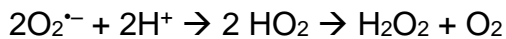
Bei der Autoxidation von oxygeniertem Hämoglobin zu Methämoglobin entsteht immer ein Hyperoxid/ Superoxid ($O_2^{\bullet -}$).



Dieses Sauerstoffradikal gehört zu den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die die Zellen schädigen können.

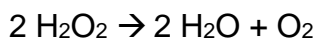
Verschiedene Mechanismen schützen die Erythrozyten normalerweise vor Schädigungen durch ROS. Zum einen inaktivieren die Enzyme Superoxiddismutase und Katalase, sowie das Antioxidans Glutathion, mit Hilfe der Glutathionperoxidase, die ROS.

Superoxiddismutase (SOD):



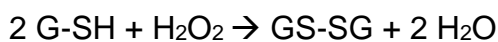
Das bei der SOD- Reaktion gebildete H_2O_2 kann durch die Enzyme Katalase und Glutathionperoxidase entgiftet werden.

Katalase:



Glutathionperoxidase:

Glutathion \rightarrow Glutathion-Disulfid



Zum anderen schützen Membranantioxidantien, wie Vitamin E, insbesondere in Kombination mit Vitamin C, vor Lipidperoxidation. Vitamin E ist in der Lage Wasserstoffatome an Peroxyradikale abzugeben, sodass daraus Hydroperoxide entstehen. Das entstandene Vitamin E- Radikal selbst ist stabil, und kann durch Vitamin C wieder zurückreduziert werden. (Clemens and Waller, 1987)

Die Zugabe von Vitamin E zu Erythrozytenkonzentraten könnte daher einen positiven Effekt auf die Zellen haben. Allerdings ist Vitamin E fett- und nicht wasserlöslich, wodurch die Verteilung im Reservoir erschwert wird. Aus diesem Grund wurde das wasserlösliche Vitamin E- Derivat Trolox zusätzlich zu den Konzentraten gegeben.

Lipidperoxidation kann im Zusammenhang mit Hämoglobin durch Wasserstoffperoxid (als Produkt der Superoxiddismutasereaktion, s.o.) und MetHb ausgelöst werden.

Hierbei gibt es verschiedene Reaktionen, die allesamt zur Bildung von ROS führen.

Die Reaktionen von H_2O_2 mit OxyHb zu Ferryl-Hämoglobin bzw. mit MetHb zu Oxoferryl-Hämoglobin, welche beide starke Oxidantien sind. Reagiert wiederum Ferryl-Hb mit H_2O_2 , so entsteht ein weiteres Superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Diese Reaktion scheint den Hämabbau zu fördern und zu Hydroperoxyradikalen zu führen, die ihrerseits Lipidperoxidation initiieren. (Nagababu and Rifkind, 2000)

Die Komplexität der verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten von MetHb ist in Abb.14 gezeigt.

Reagiert MetHb mit Wasserstoffperoxid können zwei verschiedene Oxidantien entstehen. Zum einen, wie oben beschrieben, Oxoferryl-Hämoglobin, zum anderen ein Proteinradikal, das auf der Globinkette zentriert ist. Dieses kurzlebige Ferryl-Radikal reagiert mit Sauerstoff zu einem Peroxylradikal ($\text{ROO}\cdot$). Dieses wiederum kann zur irreversiblen Umwandlung des Hämoglobins zu Choleglobin und Sulfhämoglobin führen. Diese Derivate können Lipide binden und wurden mit Membranschädigungen in Verbindung gebracht. (Moxness et al., 1996)

Methämoglobin kann außerdem zu sogenannten Hemichromen umgewandelt werden. Bei der Bildung von reversiblen Hemichromen wird das am MetHb gebundene Wassermolekül durch eine Aminosäure (Histidin) ersetzt. Durch diesen Oxidationsprozess wird ein Superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) frei, das zu Zellwandschädigung führen kann. Es kann außerdem auf Grund von größeren Deformationen in der Tertiärstruktur des Hämoglobins zur Bildung von irreversiblen Hemichromen kommen. Diese sind anfällig für weitere oxidative Schädigungen und es kann zur Auflösung der Häm-Einheit kommen. Es wurde gezeigt, dass freies Häm oxidative Schädigungen an benachbarten Membrananteilen fördert. (Rachmilewitz et al., 1971)

Normalerweise wird freies Häm durch das Enzym Hämoxygenase zu Fe^{3+} , Biliverdin und CO abgebaut. In vitro wurde gezeigt, dass die Freisetzung von Eisen durch Glutathion und Wasserstoffperoxid gefördert wird. (Atamna and Ginsburg, 1995; Nagababu and Rifkind, 1998)

Freies Eisen kann als Katalysator in der Haber-Weiss- Reaktion wirksam sein und mit Wasserstoffperoxid zur Bildung von Hydroxylradikalen ($\cdot\text{OH}$) führen. Diese sind hochreaktiv und können oxidative Schädigung verschiedenster Zellkomponenten verursachen.



(Clemens and Waller, 1987; Kanas and Acker, 2010)

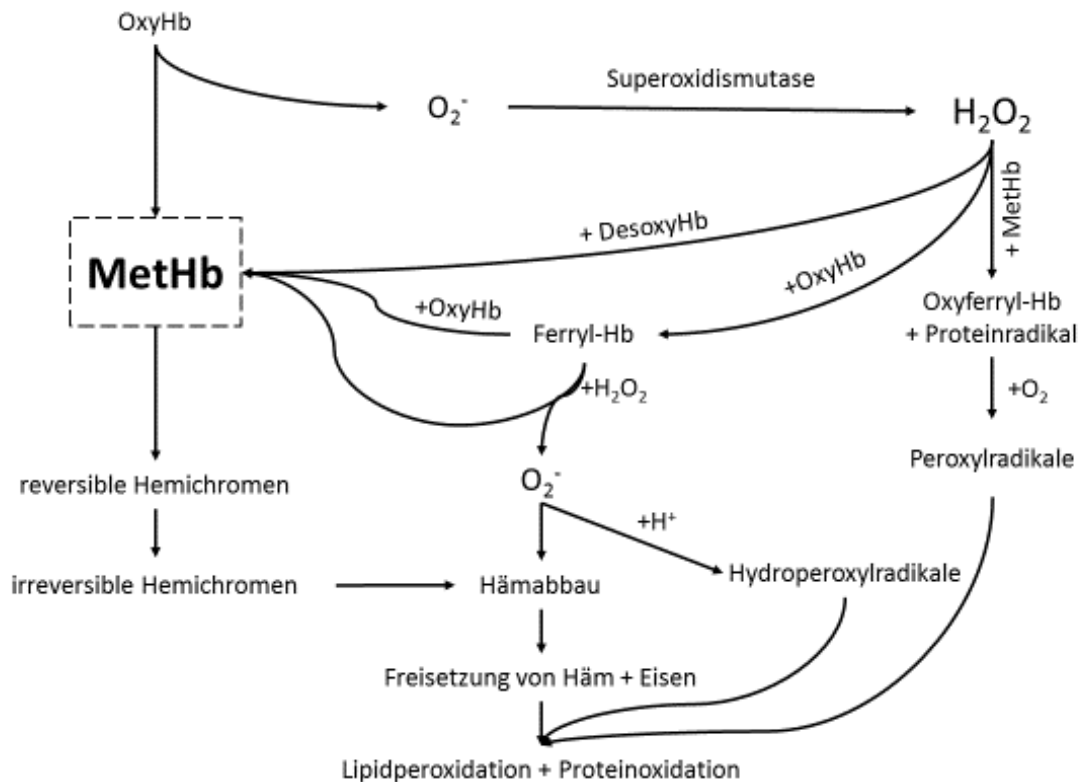


Abbildung 14: Hämoglobinoxidation und Bildung von ROS

modifiziert nach (Kanas and Acker, 2010)

Bei der Oxidation von OxyHb zu MetHb wird ein Hyperoxid frei. Das Enzym Superoxiddismutase inaktiviert das Hyperoxid durch Überführung in H_2O_2 . H_2O_2 reagiert mit DesoxyHb zu MetHb, mit OxyHb zu Ferryl-Hb und mit MetHb zu Oxyferryl-Hb und einem Proteinradikal. Bei weiterer Reaktion mit O_2 entstehen Peroxylradikale.

Reagiert Ferryl-Hb weiter mit OxyHb entsteht weiteres MetHb. Bei Reaktion mit H_2O_2 entsteht zusätzlich ein Superoxid. Superoxide werden durch Reaktion mit Protonen zu Hydroperoxylradikalen.

Methämoglobin kann außerdem zu Hemichromen umgewandelt werden. Bei der Bildung reversibler Hemichromen wird ein Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) frei, die Bildung von irreversiblen Hemichromen kann zur Auflösung der Häm-Einheit führen. Das freigesetzte Eisen katalysiert dann in der Haber-Weiss und Fenton- Reaktion die Bildung weiterer ROS.

Die ROS führen zu Lipidperoxidation und Proteinoxidation.

Auf Grund dieser Vielzahl an Möglichkeiten der Zellschädigung durch ROS, ist es sinnvoll zu untersuchen, inwieweit eine Zugabe von Antioxidantien zu Erythrozytenkonzentraten, während der extrakorporalen Zirkulation, Vorteile mit sich bringt.

In einer Studie wurde die Wirkung von Vitamin C und N-Acetylcystein auf gelagerte Erythrozyten untersucht. Beobachtet wurde unter anderem eine Verbesserung des Glutathion-Gleichgewichts, was zu geringerer Hämolyse und einer geringeren Ansammlung von Malondialdehyd (MDA) führte. Malondialdehyd dient als Biomarker für Lipidperoxidation. Die Studie weist also darauf hin, dass es Vorteile durch die Zugabe von Antioxidantien geben könnte. (Pallotta et al., 2014)

In der von uns durchgeführten Studie wurde an Erythrozyten- Ghosts auch untersucht, inwieweit Trolox und Deferoxamin die durch H_2O_2 ausgelöste Lipidperoxidation zu beeinflussen vermögen. (Krampen et al., 2018) Gemessen wurde die Bildung von Malondialdehyd, und es konnte sowohl durch Zugabe von Trolox (0,05 mg/ml), als auch durch Zugabe von Desferoxamin (0,25mg/ml) zu den Erythrozyten-Ghosts eine Verringerung von MDA festgestellt werden. Ein noch weiterer Rückgang der MDA- Bildung konnte durch eine Kombinationsgabe von Trolox und DFO erreicht werden. Deferoxamin bildet mit dreiwertigen Eisenionen Chelatkomplexe. (Novartis, 2011) Es ist in der Lage, freies Eisen zu binden, und so die Zellen vor den Folgen der durch Eisen katalysierten Haber-Weiss- Reaktion zu schützen, bei denen hochreaktive Hydroxylradikale entstehen, die Zellen schädigen können. (Clemens and Waller, 1987)

In vorliegender Studie wurden die Antioxidantien erst unmittelbar vor Beginn der Zirkulation in der Herz-Lungen-Maschine zu den Erythrozytenkonzentraten gegeben. Interessant wäre es, in weiteren Studien zu überprüfen, ob eine Zugabe der Antioxidantien schon während der Lagerung der Erythrozyten bei 4°C den MetHb- Anstieg während der Zirkulation in der HLM verringern könnte.

Es gibt Hinweise, dass durch die übliche Lagerung der Erythrozytenkonzentrate unter Kühlung, die Hämoglobin- Oxidation beeinflusst werden kann. In einer Studie wurde beobachtet, dass die Hämoglobin- Autoxidation durch die Zellalterung

und durch Veränderungen in den Erythrozyten, wie z.B. den Rückgang von anti-oxidantischer Aktivität, beschleunigt werden kann und die Konzentration von intrazellulären ROS somit ansteigen lassen kann. In dieser Studie wurden allerdings nicht-leukozytendepletierte Blutkonserven verwendet. Es muss also berücksichtigt werden, dass die durch Neutrophilen möglicherweise erzeugten ROS ebenso Einfluss auf die Lipidperoxidation in jener Studie nehmen. (Jóźwik et al., 1997)

Die Ergebnisse vorliegender Studie, mit Verwendung von leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten, zeigen, im Gegensatz dazu, nur einen geringfügigen Anstieg des Methämoglobins aufgrund der Lagerung.

Der deutliche Anstieg des MetHb ist erst nach Beginn der mechanischen Beanspruchung der Erythrozyten in der Herz- Lungen- Maschine und der Temperaturerhöhung von 4°C auf 37°C zu beobachten.

Die Autoxidation von Hämoglobin nimmt, mit abnehmendem Blut-pH und Sauerstoffpartialdruck, zu. (Jóźwik et al., 1997) Der Anstieg des Methämoglobins kann also zum Teil auf den abnehmenden pH- Wert während der Zirkulation in der Herz-Lungen-Maschine zurückgeführt werden. Betrachtet man allerdings die Versuchsreihen einzeln, so lässt sich feststellen, dass beispielsweise in der zweiten Versuchsreihe auch bei stabilem pH-Wert der Anteil an MetHb zunimmt. Folglich müssen noch andere Einflussfaktoren die Bildung von MetHb beeinflussen.

Es sollte also weiterhin untersucht werden, wie sich die MetHb- Bildung unter extrakorporaler Zirkulation durch Zugabe von geeigneten Pufferzusätzen und damit stabilem pH- Wert verhält.

MetHb ist nicht in der Lage Sauerstoff zu transportieren und ein MetHb- Anteil von 15-20% führt beim Menschen zu einem peripheren Sauerstoffmangel, der sich durch Kopfschmerzen, Zyanose und schließlich Bewusstlosigkeit zeigt. Die Zunahme des MetHb durch Zirkulation in der Herz- Lungen- Maschine ist also für den menschlichen Körper, der beispielsweise bei Operationen von Erythrozytenkonzentraten und extrakorporaler Zirkulation abhängig ist, nicht unerheblich.

Es ist bekannt, dass durch die Lagerung der Erythrozytenkonzentrate das NADH/NAD⁺-Verhältnis und somit auch die Rückführung von MetHb zu Hämoglobin beeinflusst wird. (D'Alessandro et al., 2015) Hierbei ergibt sich allerdings auch ein weiterer Ansatzpunkt. Wie in Abbildung 15 gezeigt, steht das vermehrt für die Rückführung von MetHb verbrauchte NADH somit in vermindertem Umfang für die Umwandlung von Pyruvat in Laktat zur Verfügung. Beide Reaktionen werden zur Aufrechterhaltung der Glykolyse benötigt. (Krampen et al., 2018)

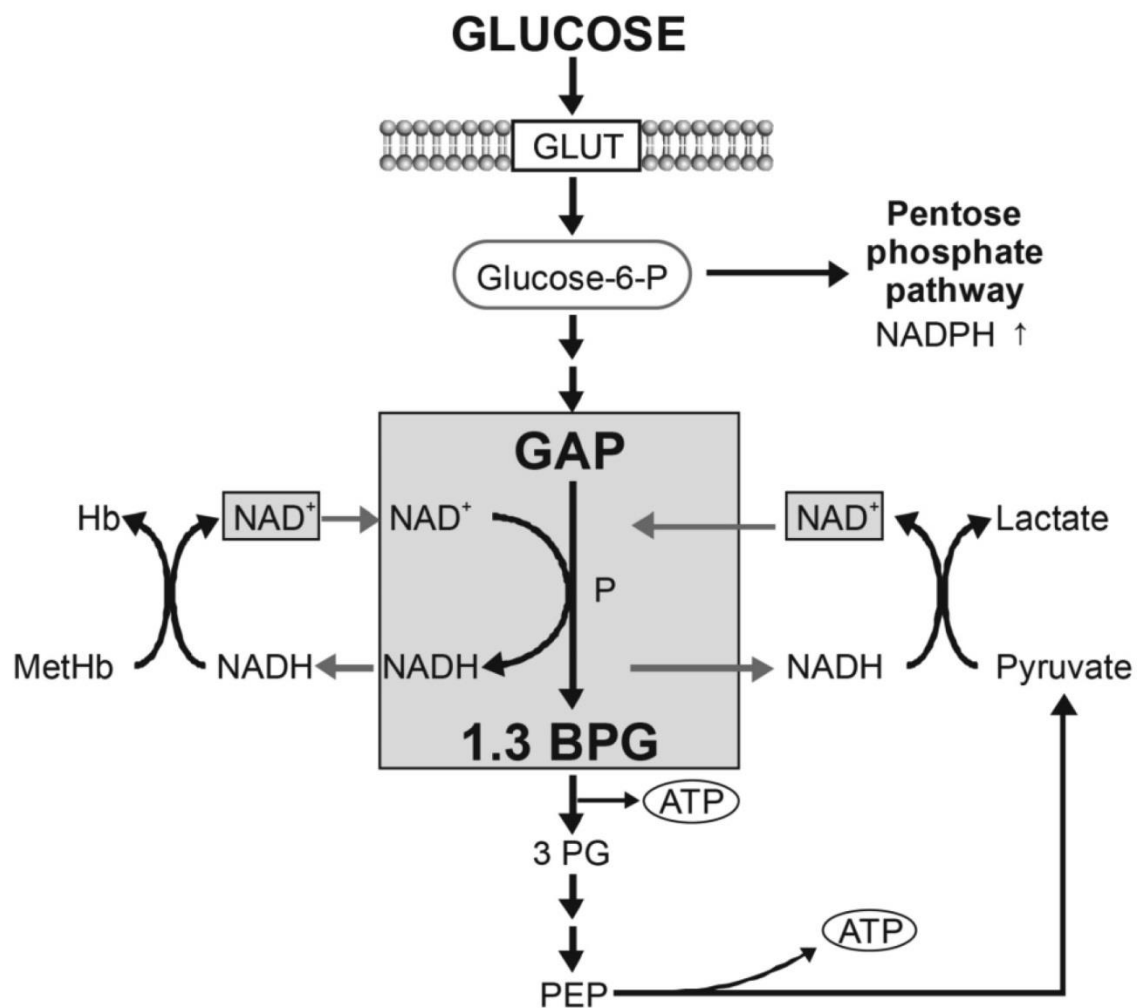


Abbildung 15: Die Rolle von NAD⁺ bei der Glykolyse von Erythrozyten

NAD⁺ wird in der GAP- DH- Reaktion der Glykolyse (grauer Bereich) benötigt, in der es zu NADH reduziert wird. Normalerweise wird das meiste NADH in der LDH- Reaktion generiert, um die Glykolyse fortzuführen. Die Hypothese besagt, dass bei großen Mengen MetHb mehr NADH für die Reduktion von MetHb zu Hb benötigt wird, und somit NADH in vermindertem Umfang für die LDH- Reaktion zur Verfügung steht. Folglich wird weniger Laktat aus Pyruvat generiert.

ATP: Adenosintri-phosphat, GAP: Glycerinaldehyd-3-phosphat, GAP-DH: GAP-Dehydrogenase, Glucose-6-P: Glukose-6-Phosphat, Hb: Hämoglobin, LDH: Laktatdehydrogenase, MetHb: Methämoglobin, NAD: oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotid, NADH: reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid, NADPH: Nicotinsäureamidadenindinukleotidphosphat, 1,3BPG: 1,3-Biphosphoglycerat, 3PG: 3-Phosphoglycerat, PEP: Phosphoenolpyruvat, P: Phosphat

(Krampen et al., 2018)

Die somit erhöhte Pyruvatkonzentration wiederum könnte sich positiv auf die Erythrozyten auswirken, da Pyruvat in der Lage ist H_2O_2 zu binden und unschädlich zu machen. (Salahudeen et al., 1991) Wie bereits ausgeführt, ist H_2O_2 an vielen Mechanismen im Zusammenhang mit der Bildung von ROS und Lipidperoxidation beteiligt. Die Verringerung von H_2O_2 könnte also zur Stabilität der Erythrozyten beitragen.

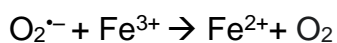
Aus dem größeren Anteil an MetHb folgt, wie bereits erwähnt, eine damit verbundene erhöhte Bildung von ROS. Da in vorliegender Studie lediglich von der Konzentration des MetHb auf das Vorhandensein von ROS zurückgeschlossen werden kann, muss weiterhin beachtet werden, dass gegebenenfalls sogar noch mehr ROS vorhanden sein könnten, da ein Teil des MetHbs stetig durch das Enzym MetHb-Reduktase wieder in Hämoglobin zurückgeführt wird.

Um die Zellen vor Lipidperoxidation zu schützen, wurde in dieser Studie neben Vitamin E und dem Vitamin- E- Derivat Trolox auch der Eisenchelator Deferoxamin verwendet, um die Zellen vor den Folgen der, durch Eisen katalysierten, Haber-Weiss und Fenton- Reaktionen zu schützen, bei denen hochreaktive Hydroxylradikale entstehen.

Die Haber-Weiss- Reaktion



läuft in Gegenwart von Übergangsmetallen wie Eisen sehr viel schneller ab und unterteilt sich in die Reduktion des Eisens und die Fenton- Reaktion.



Hydroxylradikale sind in der Lage Lipidperoxidation zu verursachen, Enzyme der Erythrozyten zu inaktivieren und Hämoglobin zu denaturieren. (Clemens and Waller, 1987)

Eisen kann im Laufe der Lagerung von Erythrozyten freigesetzt werden und unter anderem, durch oben genannte Zusammenhänge, Schädigungen an den Zellen herbeiführen („iron hypothesis“). (Hod and Spitalnik, 2012)

Die Auswirkungen des Methämoglobinanstiegs und mögliche Vorteile durch die Zugabe von Vitamin E, Trolox und Desferoxamin wurden anhand verschiedener Parameter untersucht.

Ein Mittel zur Untersuchung der Erythrozyten ist deren Widerstandsfähigkeit gegenüber einer hypotonen Na-Cl- Lösung, also deren osmotischer Resistenz. Hierbei ergaben sich in allen drei Versuchsreihen für eine Hämolyse von 50% der Erythrozyten nur Werte im Normalbereich, es konnte weder eine gesteigerte noch eine verminderte Widerstandsfähigkeit festgestellt werden und zwar sowohl bei Proben mit als auch bei Proben ohne Zusätze. Der beobachtete Anstieg des MethHbs und die resultierende Bildung von ROS scheint sich also in einem Maße zu bewegen, dem die Erythrozyten unter den gewählten Versuchsbedingungen standhalten können.

Geringere Effekte auf die roten Blutzellen sind aber deshalb trotzdem nicht auszuschließen.

Die in dieser Studie untersuchten Parameter als Hinweis einer Eryptose zeigten durchaus Effekte auf die Zellen. Eryptose bezeichnet den programmierten Zelltod von Erythrozyten. Sie ist gekennzeichnet durch verschiedene Veränderungen an den Zellen. Beispielsweise durch oxidativen Stress werden unselektive Kationenkanäle der Zelle aktiviert, und es kommt zu einem vermehrten Calciumeinstrom in die Zelle. Durch den Calcium- Einstrom wird das Protein Scramblase aktiviert, das für die Exposition von Phosphatidylserin an der Zellmembran verantwortlich ist. Weiterhin werden Calcium-abhängige Kaliumkanäle aktiviert, wodurch es zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran kommt. Dies versucht die Zelle durch Chloridausstrom zu kompensieren, was aber eine extrazelluläre Hyperosmolarität verursacht, die zu Wasserverlust und damit zur Schrumpfung der Zelle führt. (Hermlle, 2007; Lang and Lang, 2015; Lang et al., 2012)

Die durchschnittliche Zellgröße zunächst blieb über den Verlauf der sechs Stunden unverändert, unabhängig davon, wie lange die Zellen zuvor gelagert waren (siehe Abbildung 11).

Die Messung der Phosphatidylserinexposition (siehe Abbildung 12) zeigte bei sechs Tage gelagerten Erythrozytenkonzentraten weder vor noch nach der Beanspruchung der Zellen durch die extrakorporale Zirkulation, Veränderungen. Dies änderte sich aber bei 20 bzw. 34 Tage gelagerten Konzentraten. Hier war die Phosphatidylserinexposition von Beginn an höher. Bei 34 Tage gelagertem Blut, stieg die Exposition während der Zirkulation nochmals an.

Diese Beobachtung deckt sich mit dem auffälligen Anstieg des MetHb. Die vermehrte Bildung von ROS durch den MetHb- Anstieg und der somit erhöhte oxidative Stress, führt zu vermehrter Phosphatidylserinexposition. (Kuypers and de Jong, 2004) Die Phosphatidylserinexposition stieg allerdings auch bei den mit Antioxidantien und Eisenchelator versetzten Konzentraten in vergleichbarem Ausmaß an.

Die Exposition von Phosphatidylserin stellt ein wesentliches Charakteristikum der Eryptose dar und führt zur Phagozytose der Erythrozyten durch Makrophagen. Hierbei kommt es also nicht zur Hämolyse. (Lang et al., 2006) Dies deckt sich mit den Beobachtungen dieser Studie, die keine erhöhte Hämolyse der Erythrozyten zeigte. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Erythrozyten aufgrund des oxidativen Stresses durch Eryptose, nicht durch Hämolyse, abgebaut werden.

Die Messung des intrazellulären Calciumspiegels ergab eine leichte Steigerung bei 20 und 34 Tage gelagertem Blut nach sechsständiger Zirkulation in der Herz-Lungen-Maschine. Bei nur 6 Tage gelagertem Blut blieb ein Effekt durch die Zirkulation aus. Der mechanische Stress und der Temperatursprung von 4° auf 37° scheinen länger gelagerte Konzentrate also mehr zu beeinflussen.

In dieser Studie waren während der Zirkulation in der Herz- Lungen- Maschine keine positiven Effekte durch den Einsatz der Antioxidantien bzw. des Eisenchelators nachweisbar. Dennoch sollte der Einsatz weiter in Erwägung gezogen werden, z.B. durch direkte Zugabe zu den Erythrozytenkonzentraten während

der Lagerung bei 4°C, und in weiteren Studien überprüft werden, da die Zugabe von Trolox und Desferal bei der Bildung von Malondialdehyd, als Marker für Lipidperoxidation, eine deutliche Verringerung herbeiführen. (Krampen et al., 2018)

Diese Studie mit drei Versuchsreihen gibt einen eindeutigen Hinweis auf die Auswirkung der extrakorporalen Zirkulation auf die Erythrozyten und den bemerkenswerten Anstieg des Methämoglobins.

Der Umfang dieser Studie ist aber natürlich begrenzt und sie kann daher ein Anhaltspunkt sein, jedoch müssen auch deutlich die individuellen Unterschiede der verschiedenen Erythrozytenkonzentrate beachtet werden. Sicherlich sind weitere umfangreichere Studien notwendig, um den Sachverhalt weiter zu untersuchen und weitere Auswirkungen des MetHb- Anstiegs zu prüfen.

5 Zusammenfassung

Bei der Lagerung von Erythrozytenkonzentraten kommt es zu Lagerungsschäden, sog. "storage lesions". Inwiefern diese später Einfluss auf den Gesundheitszustand der Patienten haben, die die Erythrozytenkonzentrate transfundiert bekommen, ist nach wie vor umstritten. Dennoch können negative Effekte auf die Zellen nicht ausgeschlossen werden. Die Auswirkungen könnten durch den Einsatz von extrakorporaler Zirkulation, die oftmals bei Operationen benötigt wird, noch verstärkt werden, da die Erythrozyten hier, neben der deutlichen Temperaturerhöhung, zusätzlich außergewöhnlicher mechanischer Belastung ausgesetzt sind.

In dieser Studie wurde untersucht, wie sich die unterschiedliche Lagerungszeit der Erythrozytenkonzentrate bei 4°C (6, 20 und 34 Tage) auf verschiedene Parameter der Erythrozyten nach Zirkulation in einer Herz- Lungen- Maschine bei 37°C auswirkt. Es wurden Proben nach verschiedener Zirkulationsdauer (0, 2, 4, 6 Stunden) entnommen. Weiterhin wurde untersucht, ob die Zugabe von Antioxidantien (Vitamin E und Trolox) und eines Eisenchelators (Deferoxamin) unmittelbar vor Zirkulation in der Herz- Lungen- Maschine positiven Einfluss auf die Erythrozyten mit sich bringt.

Es wurde ein deutlicher Anstieg von Methämoglobin während der Zirkulation in der Herz- Lungen- Maschine beobachtet. Nur aufgrund der Lagerung blieb der MetHb- Anteil in allen Versuchsreihen nahezu gleich. Die Temperaturerhöhung und der mechanische Stress durch extrakorporale Zirkulation haben umso größeren Einfluss auf den Methämoglobinanteil der Erythrozyten, je länger diese zuvor gelagert wurden. Die mit dem Anstieg des MetHb einhergehende Bildung von radikalen Sauerstoffspezies, und daraus resultierendem oxidativen Stress, legt den Einsatz von Antioxidantien und Eisenchelatoren nahe, um Zellschädigungen zu vermeiden. Hierbei konnten in dieser Studie allerdings keine nennenswerten Vorteile ausgemacht werden.

Unter den in dieser Studie untersuchten Parametern als Hinweis einer Eryptose konnte ein erhöhter intrazellulärer Calciumspiegel nach Zirkulation der 20 bzw.

34 Tage gelagerten Erythrozyten festgestellt werden. Zum anderen zeigte sich bei diesen Konzentraten eine vermehrte Exposition von Phosphatidylserin, welche ein wesentliches Charakteristikum der Eryptose darstellt und zur Phagozytose der Erythrozyten durch Makrophagen führt.

Weitere Versuche sollten die Auswirkungen des Met-Hb- Anstiegs und den Einsatz von Antioxidantien und Eisenchelatoren erneut prüfen, um Verbesserungen beim Einsatz von Erythrozytenkonzentraten zu erreichen.

6 Literaturverzeichnis

- ATAMNA, H. & GINSBURG, H. 1995. Heme Degradation in the Presence of Glutathione: A PROPOSED MECHANISM TO ACCOUNT FOR THE HIGH LEVELS OF NON-HEME IRON FOUND IN THE MEMBRANES OF HEMOGLOBINOPATHIC RED BLOOD CELLS. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 24876-24883.
- AUBRON C, N. A., COOPER DJ, BELLOMO R 2013. Age of red blood cells and transfusion in critically ill patients. *Annals of Intensive Care*, 3, 2.
- BENNETT-GUERRERO E, V. T., DOCTOR A, ET AL. 2007. Evolution of adverse changes in stored RBCs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 17063–17068.
- BÖCK, P. D. M. M. 2019. *Vorlesung Transfusionsmedizin* [Online]. Available: <https://www.transfusionsmedizin-vorlesung.de/vorlesung-transfusionsmedizin/> [Accessed 2019].
- BUNDESÄRZTEKAMMER 2003. Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten. Köln: Deutscher Ärzte Verlag.
- CLEMENS, M. R. & WALLER, H. D. 1987. Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 45, 251-268.
- D'ALESSANDRO, A., KRIEBARDIS, A. G., RINALDUCCI, S., ANTONELLOU, M. H., HANSEN, K. C., PAPASSIDERI, I. S. & ZOLLA, L. 2015. An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies. *Transfusion*, 55, 205-219.
- DIDECO D702 Masterflo 51, Instructions for Use.
- FISCHER, S. H. 2016. *Der Einfluss von Phloretin auf den programmierten Zelltod von Erythrozyten*. Dissertation, Eberhard Karls Universität Tübingen.
- FUNK, M. & HEIDEN, M. 2017. Hämovigilanz-Bericht des Paul-Ehrlich-Instituts 2015: Auswertung der Meldungen von schwerwiegenden Reaktionen und Zwischenfällen nach § 63i AMG. Paul-Ehrlich-Institut (PEI, Langen), Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel
- GREINACHER, A., FENDRICH, K. , ALPEN, U. AND HOFFMANN, W. 2007. Impact of demographic changes on the blood supply: Mecklenburg-West Pomerania as a model region for Europe. *Transfusion*, 47, 395-401.
- GRESSNER, A. M. & ARNDT, T. 2013. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, Springer-Verlag.
- HERMLE, T. F. 2007. *Programmierter Zelltod fetaler Erythrozyten*. Dissertation, Eberhard Karls Universität Tübingen.
- HESS, J. R. 2010. Red cell changes during storage. *Transfusion and Apheresis Science*, 43, 51-59.
- HOD, E. A. & SPITALNIK, S. L. 2012. Stored red blood cell transfusions: Iron, inflammation, immunity, and infection. *Transfusion Clinique et Biologique*, 19, 84-89.
- HUANG, S.-W., HOPIA, A., SCHWARZ, K., FRANKEL, E. N. & GERMAN, J. B. 1996. Antioxidant Activity of α -Tocopherol and Trolox in Different Lipid Substrates: Bulk Oils vs Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 444-452.
- HUPPELSBERG, J. & WALTER, K. 2009. *Kurzlehrbuch Physiologie*, Stuttgart, Thieme.
- JÓŹWIK, M., JÓŹWIK, M., JÓŹWIK, M., SZCZYPKA, M., GAJEWSKA, J. & LASKOWSKA-KLITA, T. 1997. Antioxidant defence of red blood cells and plasma in stored human blood. *Clinica Chimica Acta*, 267, 129-142.
- KANIAS, T. & ACKER, J. P. 2010. Biopreservation of red blood cells – the struggle with hemoglobin oxidation. *The FEBS Journal*, 277, 343-356.

- KOCH, C. G., LI, L., SESSLER, D. I., FIGUEROA, P., HOELTGE, G. A., MIHALJEVIC, T. & BLACKSTONE, E. H. 2008. Duration of Red-Cell Storage and Complications after Cardiac Surgery. *New England Journal of Medicine*, 358, 1229-1239.
- KÖNIGSHOFF, M. 2007. *Kurzlehrbuch Biochemie*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG.
- KRAMPEN, L., KRAJEWSKI, S., ROTH, H., HANDGRETINGER, R., SCHLENSAK, C., BRUCHELT, G. & WENDEL, H. P. 2018. The age of stored erythrocytes influences methaemoglobin formation when circulated in a heart-lung machine model. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*, 16, 343-347.
- KUYPERS, F. A. & DE JONG, K. 2004. The role of phosphatidylserine in recognition and removal of erythrocytes. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 50, 147-158.
- LACROIX, J., HÉBERT, P. C., FERGUSSON, D. A., TINMOUTH, A., COOK, D. J., MARSHALL, J. C., CLAYTON, L., MCINTYRE, L., CALLUM, J., TURGEON, A. F., BLAJCHMAN, M. A., WALSH, T. S., STANWORTH, S. J., CAMPBELL, H., CAPELLIER, G., TIBERGHEN, P., BARDIAUX, L., VAN DE WATERING, L., VAN DER MEER, N. J., SABRI, E. & VO, D. 2015. Age of Transfused Blood in Critically Ill Adults. *New England Journal of Medicine*, 372, 1410-1418.
- LANG, E. & LANG, F. 2015. Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 39, 35-42.
- LANG, F., LANG, E. & FÖLLER, M. 2012. Physiology and Pathophysiology of Eryptosis. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 39, 308-314.
- LANG, F. & LANG, P. 2007. *Basiswissen Physiologie*. Heidelberg: Springer.
- LANG, P. D. F., LANG, K. S., LANG, P. A., HUBER, S. M. & WIEDER, T. 2006. Mechanisms and Significance of Eryptosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8, 1183-1192.
- LANGE, P. D. M. R. 2012. *Patienteninformationen zu Ihrer Herz-Operation*. Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie Deutsches Herzzentrum München.
- LINDENAU, S. 1996. *Durchflußzytometrische Bestimmung der zellulären Kontamination von Frischplasma aus verschiedenen Herstellungsverfahren*. Dissertation, Humboldt-Universität.
- LUTEN, M., ROERDINKHOLDER-STOELWINDER, B., SCHAAP, N. P. M., DE GRIP, W. J., BOS, H. J. & BOSMAN, G. J. C. G. M. 2008. Survival of red blood cells after transfusion: a comparison between red cells concentrates of different storage periods. *Transfusion*, 48, 1478-1485.
- MEIER, A. D. 2013. *Der Einfluss von Phlorizin auf den programmierten Zelltod von Erythrozyten*. Dissertation, Eberhard Karls Universität Tübingen.
- MOXNESS, M. S., BRUNAUER, L. S. & HUESTIS, W. H. 1996. Hemoglobin Oxidation Products Extract Phospholipids from the Membrane of Human Erythrocytes. *Biochemistry*, 35, 7181-7187.
- NAGABABU, E. & RIFKIND, J. M. 1998. Formation of Fluorescent Heme Degradation Products during the Oxidation of Hemoglobin by Hydrogen Peroxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247, 592-596.
- NAGABABU, E. & RIFKIND, J. M. 2000. Reaction of Hydrogen Peroxide with Ferrylhemoglobin: Superoxide Production and Heme Degradation. *Biochemistry*, 39, 12503-12511.
- NOVARTIS, P. 2011. *Fachinformation Desferal®* [Online]. Arzneimittel-Kompendium Schweiz. Available: <http://compendium.ch/mpro/mnr/1183/html/de#7550> [Accessed 18.06.2017].
- PALLOTTA, V., GEVI, F., D'ALESSANDRO, A. & ZOLLA, L. 2014. Storing red blood cells with vitamin C and N-acetylcysteine prevents oxidative stress-related lesions: a metabolomics overview. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*, 12, 376-387.

- RACHMILEWITZ, E. A., PEISACH, J. & BLUMBERG, W. E. 1971. Studies on the Stability of Oxyhemoglobin A and Its Constituent Chains and Their Derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, 246, 3356-3366.
- RANGE, T. 1998. *Zerebrales Monitoring in der Kinderherzchirurgie, Klinische und elektroenzephalographische Veränderungen während der ersten Minuten der extrakorporalen Zirkulation*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen.
- RASSOW, J., HAUSER, K., NETZKER, R. & DEUTZMANN, R. 2012. *Duale Reihe Biochemie*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG.
- RAUMEDIC. *ECC Schlauch und Konnektoren – Programm für die extrakorporale Zirkulation* [Online]. Available: <https://www.raumedic.com/de/technologien/extrusion/ecc-schlauch/> [Accessed 14.01. 2018].
- REICHL, F.-X. 2002. *Taschenatlas der Toxikologie: Substanzen, Wirkungen, Umwelt*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- RITTER, S., WILLAND, L., REINHARD, B., OFFERGELD, R. & HAMOUDA, O. 2008. Blutspenderpopulationen in Deutschland: Demographie und Spendeaktivität. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz*. Robert Koch-Institut, Berlin.
- SAKOTA, D., SAKAMOTO, R., SOBAJIMA, H., YOKOYAMA, N., WAGURI, S., OHUCHI, K. & TAKATANI, S. 2008. Mechanical Damage of Red Blood Cells by Rotary Blood Pumps: Selective Destruction of Aged Red Blood Cells and Subhemolytic Trauma. *Artificial Organs*, 32, 785-791.
- SALAHUDEEN, A. K., CLARK, E. C. & NATH, K. A. 1991. Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate in vitro and in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*, 88, 1886-1893.
- SEIFRIED, E., KLUETER, H., WEIDMANN, C., STAUDENMAIER, T., SCHREZENMEIER, H., HENSCHLER, R., GREINACHER, A. AND MUELLER, M. M. 2011. How much blood is needed? *Vox Sanguinis*, 100, 10-21.
- STEINER, M. E., NESS, P. M., ASSMANN, S. F., TRIULZI, D. J., SLOAN, S. R., DELANEY, M., GRANGER, S., BENNETT-GUERRERO, E., BLAJCHMAN, M. A., SCAVO, V., CARSON, J. L., LEVY, J. H., WHITMAN, G., D'ANDREA, P., PULKRABEK, S., ORTEL, T. L., BORNIKOVA, L., RAIFE, T., PUCA, K. E., KAUFMAN, R. M., NUTTALL, G. A., YOUNG, P. P., YOUSSEF, S., ENGELMAN, R., GREILICH, P. E., MILES, R., JOSEPHSON, C. D., BRACEY, A., COOKE, R., MCCULLOUGH, J., HUNSAKER, R., UHL, L., MCFARLAND, J. G., PARK, Y., CUSHING, M. M., KLODELL, C. T., KARANAM, R., ROBERTS, P. R., DYKE, C., HOD, E. A. & STOWELL, C. P. 2015. Effects of Red-Cell Storage Duration on Patients Undergoing Cardiac Surgery. *The New England journal of medicine*, 372, 1419-1429.
- VOORHUIS, F. T. R., DIELEMAN, J. M., DE VOOHT, K. M. K., VAN DIJK, D., VAN HERWERDEN, L. A., PEELLEN, L. M. & VAN KLEI, W. A. 2013. Storage time of red blood cell concentrates and adverse outcomes after cardiac surgery: a cohort study. *Annals of Hematology*, 92, 1701-1706.
- WALTHER-WENKE, G., OEHLER, M. & BÖCKER, W. 2001. Extrazelluläres Kalium in filtrierten und bestrahlten Erythrozytenkonzentraten - Messwerte und ihre Bedeutung. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 36, 20-24.
- WENDEL HP, H. W., GALLIMORE MJ, HOFFMEISTER HE 1994. Heparin-coated oxygenators significantly reduce contact system activation in an ex-vivo cardiopulmonary bypass model. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 673-678.
- ZIMMERMANN, A. K., WEBER, N., AEBERT, H., ZIEMER, G. AND WENDEL, H. P. (2007) 2007. Effect of biopassive and bioactive surface-coatings on the hemocompatibility of membrane oxygenators. *Journal of Biomed. Mater. Res.*, 80B, 433-439.

ZKT, Z. F. K. T. T. G. 2006. *Fachinformation bestrahltes Erythrozytenkonzentrat (Apherese) b-EK-Aph/TÜ* [Online]. Tübingen. Available:
<https://imedikament.de/erythrozytenkonzentrat-apherese-bestrahlt-drk-blutspendedienst/fachinformation> [Accessed 18.06.2017].

7 Anhang

7.1 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde im Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie der Universität Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Hans Peter Wendel durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Wendel in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Gernot Bruchelt.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Bernd Neumann von mir eigenständig durchgeführt.

Die Versuche, die Parameter der Eryptose betreffend, wurden von Dr. Nazneen Shaik und ihrem Team am Physiologischen Institut Tübingen I durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Medizinische Biometrie eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 10.02.2020

Heike Alexandra Heß

7.2 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Lea Krampen, Stefanie Krajewski, Heike Roth, Rupert Handgretinger, Christian Schlensak, Gernot Bruchelt, Hans P. Wendel,

The age of stored erythrocytes influences methaemoglobin formation when circulated in a heart-lung machine model, Blood Transfusion 2018; 16: 343-7

7.3 Danksagung

Ich möchte mich bei all jenen bedanken, die mir in der Zeit meiner Promotion beigestanden haben und ohne deren Hilfe diese Dissertation nicht entstanden wäre.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Hans Peter Wendel, der mich als mein Doktorvater von Beginn an begleitet hat und mich bei allen Fragen und Anliegen stets umgehend unterstützte. Danke, dass ich meine Dissertation bei Ihnen durchführen durfte.

Ebenso danken möchte ich Herrn Professor Dr. Gernot Bruchelt, der es mir durch die Konzeption dieser Studie zusammen mit Professor Dr. Wendel ermöglichte, diese Arbeit anzufertigen.

Herzlicher Dank gilt Bernd Neumann für die Einführung in die praktische Tätigkeit im Labor und die Hilfestellung bei der Versuchsdurchführung.

Dr. Nazneen Shaik und ihrem Team am Physiologischen Institut Tübingen I danke ich für die Durchführung der Versuche zur Eryptose.

Frau Aline Naumann möchte ich für den hilfreichen Einblick in die sinnvolle statistische Auswertung dieser Arbeit danken.

Großer Dank gebührt außerdem meinen Eltern, die immer an mich glauben und deren Rückhalt ich mir zweifellos sicher sein kann.

Danke Tobi für deine Motivierung, dein Verständnis und deine uneingeschränkte Unterstützung.

7.4 Lebenslauf