

Lagerung von Pferdeblut in verschiedenen Additivlösungen bei 22° und 4° C

B. Barthel¹, H. Hartmann² und G. Matthes³

¹ ehemalige Medizinische Tierklinik, Standort Mitte, Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

² Institut für Veterinär-Physiologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

³ Biochemische Forschungsgesellschaft SERATOR mbH Berlin-Marzahn

Zusammenfassung

Von 16 klinisch gesunden, adulten Pferden wurde Blut entnommen und als Vollblut (VBK) in CPDA-1-Stabilisator, als Erythrozytenkonzentrat-1 (ERY-1) in SAG-M-Stabilisator oder Erythrozytenkonzentrat-2 (ERY-2) in chloridfreier GM-Lösung konserviert. Im ERY-2 wurde vorausgehend eine Depletion der Cl⁻-Ionen durchgeführt. Die Lagerung der Pferdeblutkonserven geschah über 4 d bei 22°C und über 36 d bei 4°C. Als Vitalitätsparameter der konservierten Erythrozyten bestimmten wir folgende Parameter: Hämatologie (RBC, Hb_{gesamt}, Hb_{extrazellulär}, Hämolyserate, Hct, MCV, MCHC, MCH, Erythrozytenfragilität), Hänoximetrie (pH, p50, O₂Hb), Elektrolyte (Na⁺, K⁺, Cl⁻), Enzym (LDH), Metabolite (Glucose, Lactat, 2,3-DPG, ATP).

Bezüglich hämatologischer Parameter kam es geringfügig zum ↑MCV, ↓MCHC und nur bei 5-wöchiger Aufbewahrung zum ↑Hct. Insgesamt stellten sich die lagerungsbedingten Veränderungen nach 36 d bei 4°C deutlicher heraus: In VBK und ERY-1 sank der pH-Wert während der Lagerung nahezu stetig. Dagegen blieb im chloridarmen ERY-2 der pH über dem Ausgangsniveau. Die im Verlauf der Lagerung zunehmende Säuerung in VBK und ERY-1 bewirkte einen Abfall der intrazellulären Werte für 2,3-DPG. Dagegen blieb im ERY-2 der intraerythrozytäre 2,3-DPG-Gehalt ohne signifikante Abweichungen erhalten. Die Befunde für pH und p50 korrelierten negativ miteinander. Extrazellulär ließen Abfall von Na⁺-Ionen und Anstieg von K⁺-Ionen sowie Zunahme der extrazellulären LDH-Aktivität eine Beeinträchtigung membranaler Integrität vermuten. Der signifikante Anstieg von minimaler und maximaler Erythrozytenfragilität signalisierte ebenfalls in VBK und ERY-1, dagegen nicht im ERY-2, zunehmende membranale Instabilität der Zellen. Die ATP-Konzentration der Erythrozyten war in allen Konserven unverändert. Die durchschnittliche Hämolyserate blieb bei 4-tägiger Lagerung (22°C) mit ≤0,14% relativ gering. Sie stieg nach 36-tägiger Lagerung (4°C) nur im ERY-2 auf den nicht mehr tolerierbaren Wert von 1,01% an.

Die VBK und das ERY-1 waren nach 4-tägiger Lagerung bei 22°C und 5-wöchiger Aufbewahrung bei 4°C noch für eine Transfusion geeignet. Im ERY-2 traten am 4. Tag der 22°C-Lagerung unverträglich hohe extrazelluläre Kaliumkonzentrationen (>50 mmol/l) auf. Während der 5-wöchigen Lagerung bei 4°C war das ERY-2 bis zum 29. Tag der Aufbewahrung infolge günstiger Verläufe der erythrozytären Vitalitätsparameter den anderen Konserven überlegen.

Schlüsselwörter: Pferd, Vollblut, Erythrozytenkonzentrat, Blutkonservierung, Additivlösung, CPD, SAG-M, Chloriddepletion, Lagertemperatur, Erythrozytenvitalität

Storage of horse blood in different additive solutions at 22° and 4° C

Blood was drawn from 16 healthy, adult horses. The preservation of this blood took place in form of combining either whole blood with a CPDA-Stabilizer, erythrocyte-concentrate-1 (ERY-1) with a SAG-M-Stabilizer or erythrocyte-concentrate-2 (ERY-2) with a GM-Solution (free of chloride ions). Precede we carried out a depletion of chloride ions in ERY-2. The horse blood units were stored for either 4 days at 22°C or for 36 days at 4°C. We then determined following parameters in this blood units: hematology (RBC, Hb_{total}, Hb_{extracellular}, rate of hemolysis, Hct, MCV, MCHC, MCH, fragility of erythrocytes), hemoxymetry (pH, p50, O₂Hb), electrolytes (sodium, potassium, chloride), enzyme (LDH), metabolites (glucose, lactate, 2,3-DPG, ATP).

Concerning the hematological parameters there was a slight increase of MCV as well as a slight decrease of MCHC and at storing time of only 5 weeks the Hct increased. In total changes due to storage were more obvious at the storing temperature of 4°C: In whole blood and ERY-1 the pH level dropped almost continuously during the storing periode. In comparison to that the protone activity in ERY-2 didn't drop below the original level. The increase of acidity in whole blood and ERY-1 caused a decrease of intracellular parameter 2,3-DPG. The concentration of 2,3-DPG in ERY-2 on the other hand remained the same, without significant deviations. The results for pH and p50 correlated negatively with each other. The extracellular reduction of sodium and increase of potassium as well as the rise in extracellular LDH allow the assumption of an impaired function of membraneous integrity. The significant increase of maximal and minimal erythrocyte fragility indicated membraneous instability of the cells in whole blood and ERY-1 too, but not in ERY-2. The ATP concentration of the erythrocytes was relatively high in all preserves and remained unchanged. The average rate of hemolysis, <0,14%, after 4 days of storage at 22°C maintained relatively small. Only in ERY-2 it increased to an intolerable value of 1,01% after 36 days of storage at 4°C.

In total the whole blood and ERY-1 were still suitable for a transfusion after storing periode of 4 days at a temperature of 22°C as well as after storing time of 36 days at a temperature of 4°C. In ERY-2 the extracellular potassium level increased unjustifiably on day 4 at a temperature of 22°C (>50 mmol/l). Until day 29 during the storing periode of 5 weeks at 4°C the ERY-2 was superior to the other preserves, due to the favourable progress of the erythrocytic vitality parameters.

keywords: horse, whole blood, erythrocyte concentrate, storage of blood, additive solution, CPD, SAG-M, depletion of chlorid, storage temperature, red cell viability

Einleitung

Die Übertragung von Vollblut oder Blutbestandteilen, wie Erythrozytenkonzentrat oder Plasma, ist aus verschiedenen Gründen auch für das Pferd eine wichtige Therapiemaßnahme (Dietz und Nagel 1959; Komarek und Sova 1963; Scott und Jeffcott 1978; Michell et al. 1989; Hunt und Moore 1990; McClure 1990; Vaala 1990; Hartmann und Staufenbiel 1995; Morris 1995). Mit einer Bluttransfusion bietet sich die Möglichkeit zur (1) selektiven Substitution fehlender Blutbestandteile (Erythrozyten, Thrombozyten, plasmatische Gerinnungsfaktoren, Immunglobuline u.a.), zur (2) anhaltenden intravasalen Volumensubstitution und vermutlich zur (3) Anregung der körpereigenen Hämatopoese (Grünbaum 1993).

Um optimale Lagerungsbedingungen für die lebenden Blutzellen zu schaffen, werden das Vollblut bzw. die Blutzellen in ein geeignetes Konservierungsmedium überführt. Die Additivlösungen enthalten gerinnungshemmende und energieliefernde Substanzen. Zudem unterstützen sie in Ihrer Zusammensetzung die roten Blutzellen bei der Anpassung an veränderte Stoffwechselbedingungen, wie Absenkung von Temperatur und pH-Wert sowie Lagerung im geschlossenen System.

Während die Hämotherapie in der Humanmedizin breite Anwendung findet, gelangt sie bei Tieren trotz ähnlicher Indikationsvielfalt bisher nur im bescheidenen Umfang zum Einsatz. Studien zur Blutkonservierung bei Tieren liegen hauptsächlich von Hunden und Katzen vor (Muto 1983; Nolte 1986, 1988; Nolte et al. 1988; Price et al. 1988; Barth 1990; Sommer 1993; Wardrop et al. 1997). Diese beschränken sich zum größten Teil auf die Lagerung von Vollblutkonserven. Grundsätzlich ist aber der gezielte Einsatz von speziellen Blutfraktionen in seiner Wirksamkeit der Therapie mit Vollblutkonserven häufig überlegen.

Aufgrund dieser Situation stellten wir uns die Aufgabe, Pferdeblut zu konservieren und dabei

- 1) den Einfluss unterschiedlich zusammengesetzter Konservierungslösungen sowie verschiedener Lagertemperaturen auf Vitalitätsparameter der roten Blutzellen in Vollblutkonserven und Erythrozytenkonzentraten zu prüfen,
- 2) signifikante Beziehungen der untersuchten Parameter untereinander aufzuzeigen und
- 3) aus den erhaltenen Befunden praktische Schlussfolgerungen für die Lagerung von Pferdeblutkonserven abzuleiten.

Material und Methodik

Die hergestellten Blutkonserven stammen von 15 klinisch gesunden Warmblutpferden (Alter: 3–19 Jahre; 3 mal weiblich und 12 mal männlich-kastriert) sowie einem Kleinpferd (12 Jahre, weiblich). Einige Pferde wurden zweimal zur Blutspende herangezogen. Alle Tiere wurden zu Versuchsbeginn klinisch sowie labordiagnostisch untersucht und als gesund beurteilt (s. Barthel 1999).

Das von den Probanden entnommene Blut wurde vergleichsweise entweder als Vollblut oder als Erythrozytenkonzentrat (Herstellung s. Barthel 1999) konserviert. Dem Vollblut (Portionen mit ca. 430 ml) mischten wir jeweils 70 ml der Stabilisatorlö-

sung CPDA-1 [Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin] (Biopack Comboflex CPDA-1, Fa. Biotrans GmbH, Dreieich) zu. Für die Herstellung der Erythrozytenkonzentrate wurden ca. 440 ml Vollblut jeweils in 63 ml einer CPD-Lösung [Citrat-Phosphat-Dextrose] verbracht. Nach Zentrifugation des Gemisches und nachfolgender Abtrennung der Plasmafraktion erfolgte die Resuspension der Erythrozytensedimente (Portionen mit ca. 150 ml) in 100 ml der Additivlösung SAG-M [Saline-Adenin-Glucose-Mannitol] (Biopack Comboflex CPD/SAG-M, Fa. Biotrans GmbH, Dreieich) (Erythrozytenkonzentrat-1). Ein Teil der so gewonnenen Erythrozytenkonzentrate wurde anschließend mit chloridfreier GM-Lösung [Citrat-Phosphat-Glucose-Adenin-Mannitol] nach Matthes (1994) zweimal gewaschen und nachfolgend wiederum entweder in 50 ml (Versuch I) oder 100 ml (Versuch II) GM-Lösung resuspendiert (Erythrozytenkonzentrat-2).

Die eingesetzten Stabilisator- und Additivlösungen enthielten als Antikoagulanzen Natriumcitrat, als Puffer Natriumphosphatverbindungen, als Nährstoffe Glucose und Adenin sowie als Osmolyte Mannitol und Cl⁻-Ionen (SAG-M) oder Mannitol ohne Cl⁻-Ionen (CPDA-1, GM-Lösung). Die exakten Rezepturen der Konservierungslösungen sind bei Barthel (1999) angegeben.

Die Untersuchungen erfolgten in zwei nacheinander durchgeführten Versuchen I und II.

Versuch I: Lagerung von Vollblut und Erythrozytenkonzentraten bei Raumtemperatur (22°C); Untersuchungen über 96 Stunden (=4 d) an n=10 Vollblutkonserven, n=8 Erythrozytenkonzentraten-1 und n=6 Erythrozytenkonzentraten-2.

Versuch II: Lagerung von Vollblut und Erythrozytenkonzentraten bei Kühlschranktemperatur (4°C); Untersuchungen über 5 Wochen an n=19 Vollblutkonserven, n=11 Erythrozytenkonzentraten-1 und n=7 Erythrozytenkonzentraten-2.

Die wechselnde Zahl der einbezogenen Konserven für Vollblut bzw. Erythrozytenkonzentrate war durch unterschiedliche versuchstechnische Kapazität bedingt.

Die Probenentnahmen aus den Blutkonserven erfolgten im Versuch I täglich (s. Abb. 1–4) und im Versuch II wöchentlich (s. Abb. 5–8). In den aus den Konserven entnommenen Blutproben bestimmten wir die folgenden Parameter:

- (1) Hämatologie: Erythrozyten (T/l), Hämoglobin_{gesamt} und Hämoglobin_{extrazellulär} (g/l), Hämatokrit (l/l), MCV (fl), MCH (pg), MCHC (mmol/l) sowie Erythrozytenfragilität als minimale und maximale osmotische Resistenz (%ige NaCl-Lösung) und

$$\text{Hämolyserate (\%)} = \text{Hämatokrit} \times 100 \times \frac{\text{Hb}_{\text{extrazellulär}}}{\text{Hb}_{\text{gesamt}}}$$

- (2) Hämoximetrie: pH, p₅₀ [=Halbsättigungsdruck] (kPa) und O₂Hb [Oxy-Hämoglobin] (%);

- (3) Elektrolyte: Na⁻-, K⁺- und Cl⁻-Ionen (mmol/l);
- (4) Enzym: Lactatdehydrogenase (mkat/l);
- (5) Metabolite: Glucose (mmol/l); Lactat (mmol/l), 2,3-Diphosphoglycerat [2,3-DPG] (μmol/g Hb) und Adenosintriphosphat [ATP] (μmol/g Hb) (ausschließlich Versuch II).

Für die aufgezählten Parameter kamen die üblichen Bestimmungsverfahren eines klinisch tätigen Labors zum Einsatz. Die Konzentrationen für 2,3-DPG ermittelten wir mit dem Testbesteck 2,3-Diphosphoglycericacid (2,3-DPG) (Procedure No. 35-UV) der Fa. Sigma-Diagnostics und für ATP mit Adenosine-5'-Triphosphate (ATP) (Procedure No. 366-UV) der Fa. Sigma-Diagnostics (Details der Analysenverfahren s. Barthel 1999).

Für die statistische Auswertung nutzten wir das Programm SPSS (Version 8.0 für Windows). Die Prüfung auf Signifikanz beobachteter Unterschiede erfolgte mit dem Wilcoxon-Test (Irrtumswahrscheinlichkeit: $p < 0,05$). Die Ermittlung des Korrelationskoeffizienten r erfolgte nach Pearson. Zur Erhöhung der Sicherheit unserer Aussagen bei relativ kleinem Probenumfang wählten wir die Monte-Carlo-Technik (Simulation einer Stichprobe mit $n = 10000$) (Sachs 1978). Für die bildliche Darstellung unserer Befunde verwendeten wir Box- und Whisker-Plots.

Ergebnisse

Lagerung von Vollblut und Erythrozytenkonzentrat bei 22° C

Zu Versuchsbeginn betragen die Hämatokritwerte der Vollblutkonserven $\bar{x} \pm s = 0,35 \pm 0,11$ l/l und der Erythrozytenkonzentrate $\bar{x} \pm s = 0,53 \pm 0,05$ l/l.

Während der 4-tägigen Lagerung bei 22° C fanden wir für die hämatologischen Parameter meistens nur geringfügige Schwankungen. So traten für Erythrozytenzahl (Abb. 1), Hämoglobin_{gesamt} und Hämatokrit keine statistisch gesicherten Veränderungen gegenüber den Ausgangswerten auf. Etwas abweichend davon stieg der Median (Me) für das mittlere Erythrozytenvolumen (MCV) in allen drei Additivlösungen geringfügig an (s. Abb. 1). Mit als Folge der größeren Zellvolumina verminderten sich die Medianwerte für die mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC) ebenfalls in geringem Umfang (s. Abb. 1). Die zu diesen Ergebnissen in den Blutkonserven korrespondierend auftretende Hämolyse zeigen die Werte in Tabelle 1. Beginnend mit 3 d Lagerungszeit setzte eine verstärkte Lysis der roten Blutzellen auffallend in den Vollblutkonserven ein.

Als Ausdruck funktioneller Stabilität der Zellmembran gelten u. a. die Befunde der osmotischen Resistenz von Erythrozyten. Für die beginnende osmotische Fragilität der Pferdeerythrozyten fanden wir in allen drei Konservenarten Werte zwischen $Me_{0,d} = 0,63$ und $Me_{4,d} = 0,69$ %ige NaCl-Lösung. Die maximale osmotische Resistenz schwankte zwischen $Me_{0,d} = 0,45$ und $Me_{4,d} = 0,55$ %ige NaCl-Lösung. Die Ergebnisse wiesen keine statistisch zu sichernden Unterschiede auf.

Die Befunde in Abbildung 2, oben, lassen erkennen, dass die pH-Werte in den Konserven mit Vollblut und Erythrozytenkonzentrat-1 während des Versuchszeitraumes erwartungsgemäß nahezu kontinuierlich und signifikant abfielen. Abweichend davon setzte die statistisch gesicherte Verminderung des pH-Wertes im Erythrozytenkonzentrat-2 verzögert erst nach 48 h ein, um dann bis zum Versuchsabschluss mit 96 h jedoch den stärksten Abfall aufzuweisen.

Die Lage der O₂-Bindungskurve wird durch den Halbsättigungsdruck p50 vermittelt. Die in diesem Versuch für alle drei Kon-

servenarten bestimmten Werte für den p50 schwankten durchschnittlich zwischen 3,0 und 3,3 kPa und zeigten keine statistisch gesicherten Unterschiede sowie Veränderungen. Anders verhielten sich die Ergebnisse für das oxygenierte Hämoglobin (s. Abb. 2, unten). In den Vollblutkonserven fanden wir einen fast stetigen und ab 2 d signifikanten Abfall der Werte von $Me_{0,d} = 79$ auf $Me_{4,d} = 64\%$. Dementgegen stiegen im Erythrozytenkonzentrat-1 die Zahlen für das Oxy-Hb bis zum Versuchsende deutlich, ab 3 d signifikant an. Schließlich ermittelten wir im Erythrozytenkonzentrat-2 innerhalb der ersten 2 d wiederum einen signifikanten Anstieg, dem am letzten Versuchstag ein drastischer Abfall der Oxy-Hb-Befunde folgte (s. Abb. 2, unten).

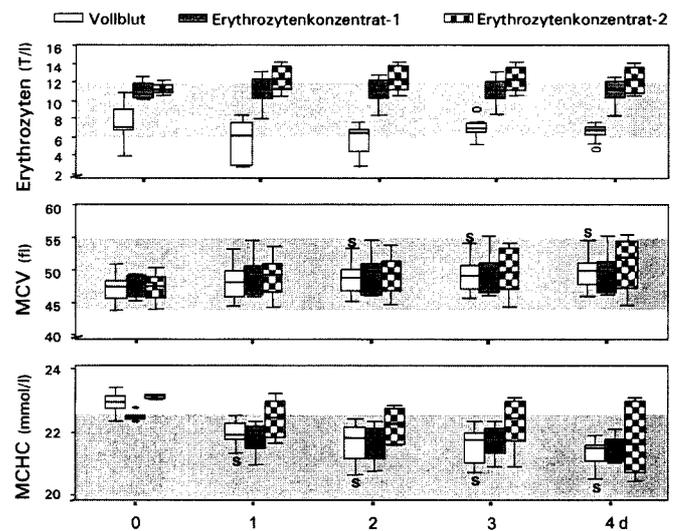


Abb. 1: Werte für Erythrozytenzahl, mittleres Erythrozytenvolumen (MCV) und mittlere erythrozytäre Hämoglobinkonzentration (MCHC) in Konserven aus Vollblut oder Erythrozytenkonzentrat während 4-tägiger Lagerung bei 22°C (s=signifikanter Unterschied zum Ausgangswert, Referenzbereich für Pferde innerhalb der grauen Zone)

Results of red blood cell count (RBC), mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) in units of full blood or erythrocyte concentrates during 4-day storage at 22°C (s=significant difference for the initial value, Reference field for horses within the gray zone)

Der durchschnittliche extrazelluläre Kaliumgehalt änderte sich in den Vollblutkonserven kaum ($Me_{0,d} = 3,4$ und $Me_{4,d} = 4,4$ mmol/l) (Abb. 3). Ganz ähnlich übertrafen die Kaliumwerte im Erythrozytenkonzentrat-1 nicht den Wert von $Me_{4,d} = 4,0$ mmol/l. Im Unterschied zu Vollblut und Erythrozytenkonzentrat-1 erhöhte sich der extrazelluläre Kaliumgehalt im chloridarmen Erythrozytenkonzentrat-2 innerhalb von 4 d der Lagerung auf Werte > 50 mmol/l (s. Abb. 3). Die außerdem bestimmten Konzentrationen für Na⁺- und Cl⁻-Ionen zeigten in allen drei untersuchten Konservenarten keine signifikanten Abweichungen im Vergleich zur jeweiligen Ausgangssituation. Im Erythrozytenkonzentrat-2 lag, methodisch bedingt, der Chloridgehalt zu Versuchsbeginn unter der Nachweisgrenze von 50 mmol/l (s. Kap. „Material und Methodik“).

Glucose dient den Erythrozyten während der Lagerung als Energiequelle (s. Barthel 1999). Demzufolge verminderten sich erwartungsgemäß die Glukosekonzentrationen in den Blutkon-

serven (Abb. 4, oben). Alle Unterschiede der durchschnittlichen Glukosekonzentrationen waren jedoch nicht signifikant. Die während der Lagerung in den roten Blutzellen stattfindende Glykolyse lässt aus Glucose das Lactat entstehen. Der vom Untersuchungszeitpunkt 2 d an signifikant erhöhte Laktatgehalt stieg in den Konserven mit Vollblut und Erythrozytenkonzentrat-1 auf etwa das 6-fache, im Erythrozytenkonzentrat-2 sogar auf etwa das 20-fache an (Abb. 4, unten). Außerdem fanden wir in den Konserven mit steigenden Laktatwerten zunehmende LDH-Enzymaktivitäten (insbesondere im Erythrozytenkonzentrat-2: $Me_{0,d}=14,6 \mu\text{kat/l}$, $Me_{4,d}=93,3 \mu\text{kat/l}$).

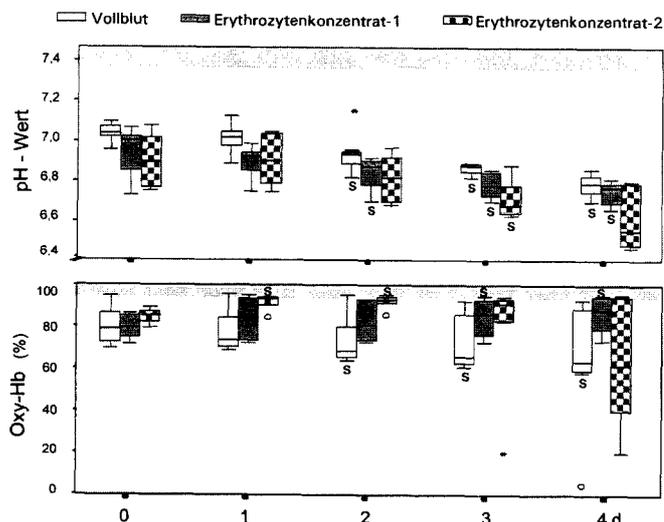


Abb. 2: Werte für pH und oxygeniertes Hämoglobin (Oxy-Hb) in Konserven aus Vollblut oder Erythrozytenkonzentrat während 4-tägiger Lagerung bei 22°C (s=signifikanter Unterschied zum Ausgangswert, Referenzbereich für Pferde innerhalb der grauen Zone)

Results of pH and oxidized hemoglobin (Oxy-Hb) in units of full blood or erythrocyte concentrates during 4-day storage at 22°C (s=significant difference for the initial value, Reference field for horses within the gray zone)

In den drei unterschiedlichen Konserven bestimmten wir für das 2,3-DPG als Ausgangsbefunde $Me_{0,d}=20,2$, $15,4$ und $37,4$ mmol/g Hb. Diese Werte veränderten sich während der 4-tägigen Lagerung nicht signifikant.

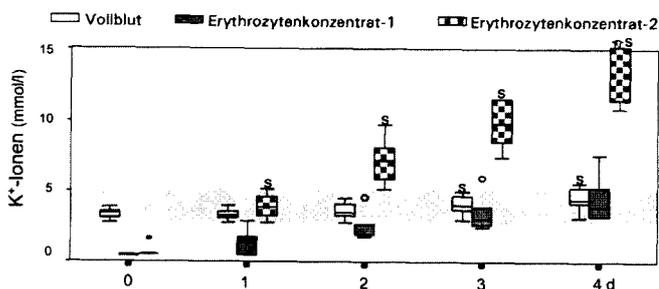


Abb. 3: Konzentration der K^+ -Ionen in Konserven aus Vollblut oder Erythrozytenkonzentrat während 4-tägiger Lagerung bei 22°C (s=signifikanter Unterschied zum Ausgangswert, Referenzbereich für Pferde innerhalb der grauen Zone)

Concentration of potassium ions in units of full blood or erythrocyte concentrates during 4-day storage at 22°C (s=significant difference for the initial value, Reference field for horses within the gray zone)

Lagerung von Vollblut und Erythrozytenkonzentrat bei 4° C

Im Versuch II senkten wir die Lagertemperatur auf 4° C (Kühlschranktemperatur) und verlängerten den Untersuchungszeitraum auf 5 Wochen. Die längere Lagerzeit der Konserven bewirkte für einige der untersuchten Parameter deutlichere Abweichungen von den Ausgangsbefunden im Vergleich zur 4-tägigen Aufbewahrung bei 22°C.

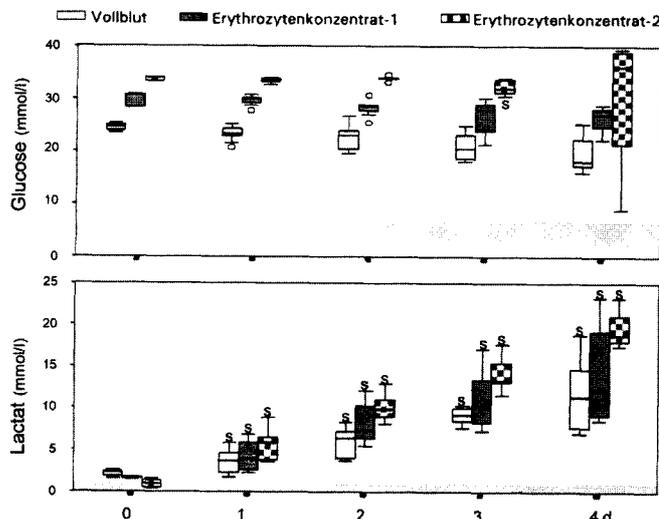


Abb. 4: Gehalt für Glucose und Lactat in Konserven aus Vollblut oder Erythrozytenkonzentrat während 4-tägiger Lagerung bei 22°C (s=signifikanter Unterschied zum Ausgangswert, Referenzbereich für Pferde innerhalb der grauen Zone)

Results of glucose and lactate in units of full blood or erythrocyte concentrates during 4-day storage at 22°C (s=significant difference for the initial value, Reference field for horses within the gray zone)

Die Parameter des roten Blutbildes zeigten tendenziell gleiche Veränderungen wie im Versuch I. Es verringerte sich die durchschnittliche Erythrozytenzahl in den drei untersuchten Konservenarten wiederum nur geringfügig oder gar nicht (Abb. 5, oben). Der dazugehörige Hämatokrit erhöhte sich signifikant in den Vollblutkonserven von $Me_{0,d}=0,29$ auf $Me_{36,d}=0,35$ l/l und im Erythrozytenkonzentrat-1 von $Me_{0,d}=0,51$ auf $Me_{36,d}=0,55$ l/l. Abweichend davon blieb der Hämatokrit in den Erythrozytenkonzentrat-2 ohne statistisch gesicherte Veränderungen. Durch die Hämatokritwerte teilweise bestätigt, erhöhten sich die Werte für MCV im Verlauf der 5-wöchigen Lagerung (Abb. 5, Mitte). Während die durchschnittlichen Anstiege der MCV-Werte in den Vollblutkonserven und Erythrozytenkonzentrat-1 nahezu stetig erfolgten, blieb der gleiche Parameter im Erythrozytenkonzentrat-2 für die erste Versuchshälfte unverändert. Erst danach vergrößerte sich das Erythrozytenvolumen signifikant (Abb. 5, Mitte). In gleicher Art, jedoch mit umgekehrten Vorzeichen, änderten sich die Ergebnisse für die mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (Abb. 5, unten). Auch hier sind die in der ersten Versuchshälfte nahezu gleichbleibenden MCHC-Werte des Erythrozytenkonzentrat-2 bemerkenswert.

In allen drei untersuchten Konservenarten des Versuches II beobachteten wir eine zunehmenden Hämolyse der Erythrozyten (s. Tab. 2). Unverkennbar traten die stärksten Zellzerstörungen

beim Erythrozytenkonzentrat-2 während der zweiten Versuchshälfte auf. Unter Bezug auf das arithmetische Mittel stieg die Hämolyserate zwischen Beginn und Ende der 5-wöchigen Lagerung in den Vollblutkonserven um das ca. 5-fache und in den Erythrozytenkonzentrat-1 um das ca. 7-fache an. Der gleiche Befund erhöhte sich für die Erythrozytenkonzentrate-2 immerhin um das 50-fache. Wird allein der Median betrachtet, vergrößerte sich die Hämolyserate im Erythrozytenkonzentrat-2 insbesondere in der letzten Untersuchungswoche von $Me_{29d}=0,44$ auf $Me_{36d}=0,82$ % auf fast das Doppelte (s. Tab. 2). Die Werte für die osmotische Resistenz der roten Blutzellen veränderten sich für Vollblut und Erythrozytenkonzentrat-1 signifikant. Die Fragilität sank im Vollblut hinsichtlich minimaler Resistenz von $Me_{0d}=0,60$ auf $Me_{36d}=0,80$ %ige NaCl-Lösung und für die maximale Resistenz von $Me_{0d}=0,45$ auf $Me_{36d}=0,54$

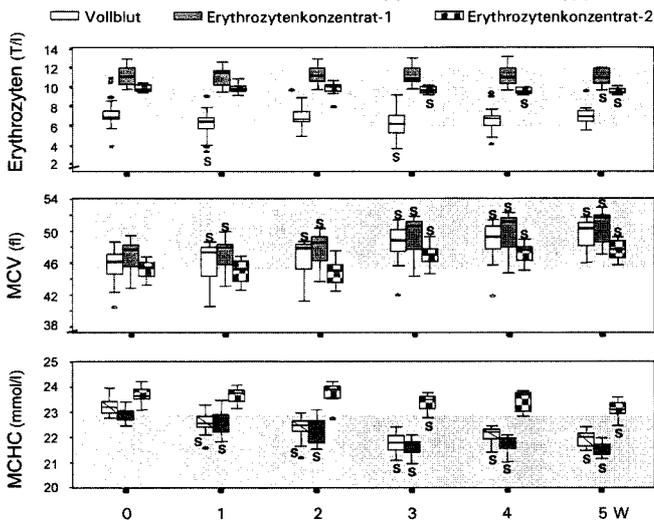


Abb. 5: Werte für Erythrozytenzahl, mittleres Erythrozytenvolumen (MCV) und mittlere erythrozytäre Hämoglobinkonzentration (MCHC) in Konserven aus Vollblut oder Erythrozytenkonzentrat während 5-wöchiger Lagerung bei 4°C. (s=signifikanter Unterschied zum Ausgangswert, Referenzbereich für Pferde innerhalb der grauen Zone)

Results of red blood cell count (RBC), mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) in units of full blood or erythrocyte concentrates during 5-week storage at 4°C (s=significant difference for the initial value, Reference field for horses within the gray zone)

%ige NaCl-Lösung. Ganz ähnliche Befunde ermittelten wir für das Erythrozytenkonzentrat-1 mit $Me_{0d}=0,60$ auf $Me_{36d}=0,85$ %ige NaCl-Lösung (minimale Resistenz) und $Me_{0d}=0,45$ auf $Me_{36d}=0,55$ %ige NaCl-Lösung (maximale Resistenz). Trotz teilweise hoher Hämolysraten traten im Erythrozytenkonzentrat-2 keine statistisch gesicherte Veränderung der minimalen oder maximalen Fragilität der Erythrozyten auf. Sehr ähnlich der 22°C-Konservierung konnte in den untersuchten Konserven mit Vollblut und Erythrozytenkonzentrat-1 ein stetiges Absinken der pH-Werte während der Lagerung ermittelt werden (s. Abb. 6, oben). Im Gegensatz dazu stieg der mittlere pH-Wert in den chloridarmen Erythrozytenkonzentrat-2 innerhalb der ersten Lagerungswoche an und sank bis zum Versuchsende nach 36 d nicht unter den Ausgangsmedian ($Me_{0d}=7,11$, $Me_{8d}=7,26$ und $Me_{36d}=7,19$).

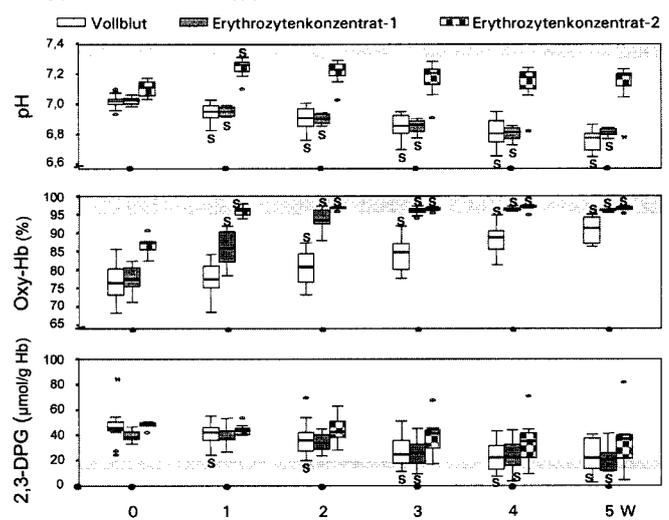


Abb. 6: Werte für pH, oxygeniertes Hämoglobin (Oxy-Hb) und 2,3-DPG in Konserven aus Vollblut oder Erythrozytenkonzentrat während einer 5-wöchigen Lagerung bei 4°C (s=signifikanter Unterschied zum Ausgangswert, Referenzbereich für Pferde innerhalb der grauen Zone)

Results of pH and oxygenated hemoglobin (Oxy-Hb) and 2,3-DPG in units of full blood or erythrocyte concentrates during 5-week storage at 4°C (s=significant difference for the output value, Reference field for horses within the gray zone)

Tab. 1: Hämolyserate (%) in Konserven aus Vollblut oder Erythrozytenkonzentrat während einer 4-tägigen Lagerung bei 22° C (Versuch I) [Angaben als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) und als Median (Me)]

Rate of hemolysis (%) in units of full blood or erythrocyte concentrates during 4-day storage at 22°C (experiment I)[Results as a arithmetic average with standard deviation ($\bar{x} \pm s$) and as median (Me)]

| Konserven | | Tag(e) nach Beginn der Lagerung | | | | |
|--------------------------|-----------------|---------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Vollblut | $\bar{x} \pm s$ | 0,02±0,01 | 0,02±0,01 | 0,02±0,01 | 0,14±0,09 | 0,10±0,06 |
| | Me | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,13 | 0,12 |
| Erythrozytenkonzentrat-1 | $\bar{x} \pm s$ | 0 | 0,01±0,01 | 0,02±0,02 | 0,01±0,02 | 0,01±0,01 |
| | Me | 0 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| Erythrozytenkonzentrat-2 | $\bar{x} \pm s$ | 0,03±0,03 | 0,03±0,04 | 0 | 0,02±0,02 | 0,04±0,05 |
| | Me | 0,03 | 0,02 | 0 | 0,01 | 0,02 |

Im Vollblut und in den Erythrozytenkonzentraten-1 fanden wir bei sich erniedrigenden pH-Werten einen signifikanten Abfall der intraerythrozytären 2,3-DPG-Konzentration (Abb. 6, unten). Dagegen waren die Werte für den gleichen Parameter in den Erythrozytenkonzentraten-2, bei denen der durchschnittliche pH nahezu unverändert blieb, mit $Me_{0,d}=48,38$ und $Me_{36,d}=36,62$ mmol/gHb nicht signifikant verschieden (s. Abb. 6, unten).

In den Erythrozytenkonzentraten-1 ging der Abfall des pH-Wertes mit dem signifikanten Anstieg der p50-Befunde von $Me_{0,d}=3,2$ auf $Me_{36,d}=4,6$ kPa einher (=Rechtsdrift der O_2 -Bindungskurve).

Bezüglich der Konzentration an extrazellulären Na^+ -Ionen fanden wir in den Konserven mit Vollblut und Erythrozytenkonzentrat-1 einen nahezu kontinuierlichen Abfall im Verlauf der Lagerung. Das Ausgangsniveau des Natriumgehaltes wurde bereits nach 1 Woche signifikant unterschritten (Abb. 7, oben). Korrespondierend zu den Verhältnissen der Na^+ -Ionen erhöhte sich der Kaliumgehalt (Abb. 7, unten). Den geringsten durchschnittlichen Anstieg des extrazellulären Kaliumgehaltes von $Me_{0,d}=3,0$ auf $Me_{36,d}=16,4$ mmol/l wiesen die Vollblutkonserven auf. Am stärksten erhöhten sich die Kaliumwerte während der 5-wöchigen Lagerung in den Erythrozytenkonzentraten-2 von $Me_{0,d}<1,0$ (=unterhalb der Nachweisgrenze) auf $Me_{36,d}=38,0$ mmol/l. Der extrazelluläre Chloridgehalt zeigte in den von uns untersuchten Blutkonserven keine nennenswerten Veränderungen. Im Erythrozytenkonzentrat-2 lagen die Chloridwerte wiederum methodisch bedingt ausnahmslos unterhalb der Nachweisgrenze (<50 mmol/l).

Gemessen am Glukoseverbrauch beobachteten wir den höchsten Stoffumsatz in den Vollblutkonserven (Abb. 8, oben). Mit dem Glukoseabfall ging ein Anstieg des Laktatgehaltes in den untersuchten Blutkonserven auf das 10- bis 13-fache einher (Abb. 8, Mitte). In allen drei Konservenarten fanden wir signifikant zunehmende LDH-Aktivitäten. Die stärksten Veränderungen waren in den Erythrozytenkonzentraten-2, gefolgt von den Erythrozytenkonzentraten-1, zu beobachten.

Die ATP-Konzentrationen aller Konserven schwankten zwischen den Werten $Me=7,47$ und $Me=18,96$ mmol/g Hb (Abb. 8, unten). Auffällige Veränderungen des ATP-Gehaltes der Erythrozyten traten während der Lagerung nicht auf.

Tab. 2: Hämolyserate (%) in Konserven aus Vollblut oder Erythrozytenkonzentrat während einer 5-wöchigen Lagerung bei 4° C (Versuch II) [Angaben als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) und als Median (Me)]

Rate of hemolysis (%) in units of full blood or erythrocyte concentrates during 5-week storage at 4° C (experiment II) [Results as a arithmetic average with standard deviation ($\bar{x} \pm s$) and as median (Me)]

| Konserve | | Tag(e) nach Beginn der Lagerung | | | | | |
|--------------------------|-----------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | 0 | 8 | 15 | 22 | 29 | 36 |
| Vollblut | $\bar{x} \pm s$ | $0,03 \pm 0,01$ | $0,04 \pm 0,01$ | $0,04 \pm 0,01$ | $0,06 \pm 0,02$ | $0,10 \pm 0,07$ | $0,16 \pm 0,07$ |
| | Me | 0,02 | 0,04 | 0,04 | 0,06 | 0,08 | 0,14 |
| Erythrozytenkonzentrat-1 | $\bar{x} \pm s$ | $0,04 \pm 0,03$ | $0,05 \pm 0,07$ | $0,06 \pm 0,08$ | $0,11 \pm 0,10$ | $0,25 \pm 0,18$ | $0,27 \pm 0,21$ |
| | Me | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,07 | 0,26 | 0,17 |
| Erythrozytenkonzentrat-2 | $\bar{x} \pm s$ | $0,02 \pm 0,01$ | $0,07 \pm 0,02$ | $0,22 \pm 0,14$ | $0,46 \pm 0,36$ | $0,67 \pm 0,49$ | $1,01 \pm 0,63$ |
| | Me | 0,02 | 0,08 | 0,17 | 0,32 | 0,44 | 0,82 |

Korrelationen zwischen ausgewählten Parametern

Inwieweit die von uns verwendeten Parameter gleiche oder ähnliche Funktionsabläufe der roten Blutzellen reflektieren, prüften wir auch mit Hilfe von Korrelationsberechnungen. Zwischen den Parametern mit Hinweisen für eine Hämolyse, wie Konzentration von extrazellulärem Hämoglobin sowie Werten für K^+ -Ionen

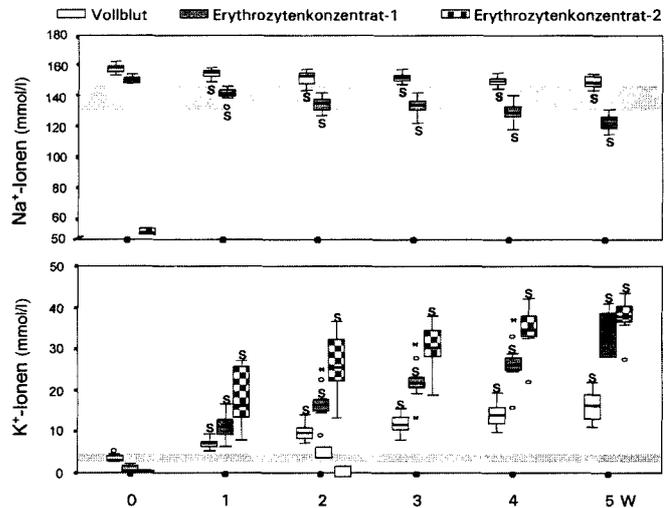


Abb. 7: Konzentration der Na^+ - und K^+ -Ionen in Konserven aus Vollblut oder Erythrozytenkonzentrat während einer 5-wöchigen Lagerung bei 4° C

[Werte für Na^+ im Erythrozytenkonzentrat-2 unterhalb der Nachweisgrenze von 50 mmol/l]; (s=signifikanter Unterschied zum Ausgangswert, Referenzbereich für Pferde innerhalb der grauen Zone)

Concentration of sodium and potassium ions in units of full blood or erythrocyte concentrates during 5-week storage at 4° C

[Values for Na^+ in the erythrocyte-concentrate-2 below the detection limit of 50 mmol/l]; (s=significant difference for the initial value, Reference field for horses within the gray zone)

und LDH im Überstand, fanden wir mehrheitlich positive und signifikante Korrelationskoeffizienten (Tab. 3). Somit darf angenommen werden, dass in den untersuchten Konserven ein Anstieg des Hb_{extrazellulär} mit erhöhtem Kaliumgehalt und vermehrter LDH-Aktivität in der extrazellulären Suspension einher geht. Die statistisch gesicherten Beziehungen waren in den über 5 Wo-

chen bei 4° C gelagerten Konserven insgesamt stärker ausgeprägt (s. Tab. 3).

Schließlich untersuchten wir noch Beziehungen zwischen dem pH-Wert und Parametern der Hämolyse sowie des intraerythrozytären Energiestoffwechsels, wie ATP und 2,3-DPG. Wie anhand der Ergebnisse in Tabelle 4 ersichtlich, ergaben sich zwischen pH-Wert und Gehalt an K⁺-Ionen sowie Hämolyserate mehrheitlich signifikant negative Korrelationen. Dieses Resultat zeigt, dass ein zunehmend sinkender pH in den Konserven statistisch nachweisbar mit stärker werdender Hämolyse einherging. Dagegen lassen die positiven Korrelationskoeffizienten zwischen pH-Befunden und Konzentrationen für 2,3-DPG erkennen, dass mit zunehmender Säuerung in den Konserven der intraerythrozytäre Energiestoffwechsel vermindert wurde (↓2,3-DPG). Für uns überraschend fanden wir zwischen pH-Wert und ATP-Konzentration negative Korrelationskoeffizienten. Außerdem führten sinkende pH-Werte zum Anstieg des p50, d.h. zum Rechtsdrift der O₂-Bindungskurve. Wiederum unterstreichen die signifikant positiven Korrelationen zwischen Hämolyserate und extrazellulärem Kaliumgehalt die diagnostische Bedeutung dieser Parameter für die Erythrozytenlyse (s. Tab. 4).

Diskussion

Funktionelle Stabilität der Erythrozyten

Während der Lagerung von Blutkonserven soll die Vitalität der Erythrozyten möglichst gering oder gar nicht beeinträchtigt wer-

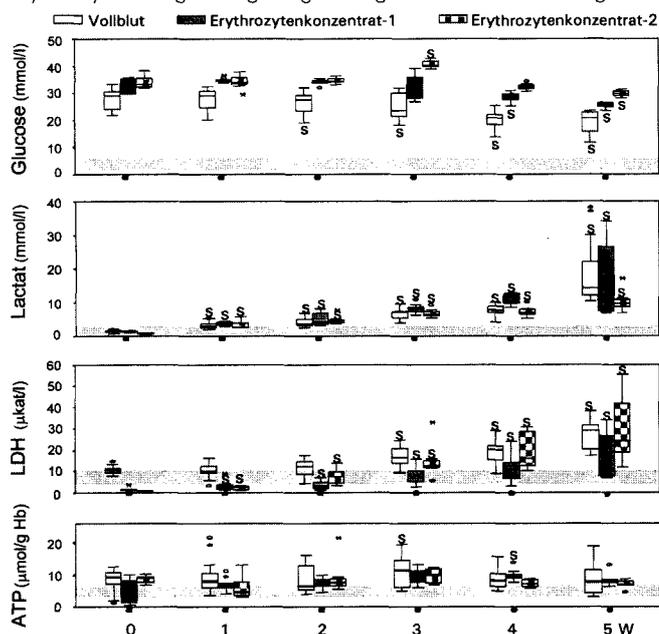


Abb. 8: Gehalt für Glucose, Lactat und ATP sowie Aktivität der Lactatdehydrogenase in Konserven aus Vollblut oder Erythrozytenkonzentrat während einer 5-wöchigen Lagerung bei 4°C (s=signifikanter Unterschied zum Ausgangswert, Referenzbereich für Pferde innerhalb der grauen Zone)

Results of glucose, lactate and ATP as well as activity of lactatedehydrogenase in units of full blood or erythrocyte concentrates during 5-week storage at 4°C

(s=significant difference for the initial value, Reference field for horses within the gray zone)

den. Mit dieser Zielstellung simulierten wir im Versuch I Praxisbedingungen, bei denen das Spenderblut alsbald zur Transfusion beim Rezipienten Verwendung findet und ohne Kühlkette nur wenige Tage gelagert wird. Im Versuch II sollte der Einfluss einer längerfristigen und möglichst schonenden Lagerung auf Funktionen der roten Blutzellen geprüft werden.

Tab. 3: Korrelationskoeffizient (r) für die Parameter LDH, K⁺-Ionen und Hämoglobin_{extrazellulär} in Konserven mit Vollblut oder Erythrozytenkonzentrat.

Irrtumswahrscheinlichkeit: * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001.

Correlation coefficient (r) of the parameters LDH, potassium ions and hemoglobin_{extracellular} in units of full blood or erythrocyte concentrates Error probability: * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001.

| Lagerungstemperatur | Konserve | LDH | | K ⁺ -Ionen | |
|---------------------|--------------------------|-----------------------------|---------|-----------------------|-------|
| | | | | | |
| 22°C | Vollblut | K ⁺ -Ionen | 0,53*** | | |
| | | HB _{extrazellulär} | -0,08 | 0,48*** | |
| | Erythrozytenkonzentrat-1 | K ⁺ -Ionen | 0,41* | | |
| | | HB _{extrazellulär} | -0,15 | | -0,02 |
| | Erythrozytenkonzentrat-2 | K ⁺ -Ionen | 0,84*** | | |
| | | HB _{extrazellulär} | -0,18 | | -0,19 |
| 4°C | Vollblut | K ⁺ -Ionen | 0,61*** | | |
| | | HB _{extrazellulär} | 0,54*** | 0,67*** | |
| | Erythrozytenkonzentrat-1 | K ⁺ -Ionen | 0,77*** | | |
| | | HB _{extrazellulär} | 0,61*** | 0,63*** | |
| | Erythrozytenkonzentrat-2 | K ⁺ -Ionen | 0,43** | | |
| | | HB _{extrazellulär} | 0,35* | 0,65*** | |

Lagerungsbedingte Funktionsveränderungen der Erythrozyten wurden im geringen Umfang durch Abweichungen der Erythrozyten-Indizes, am deutlichsten jeweils im Vollblut, signalisiert (Abb. 1 und 5). Die durchschnittliche Vergrößerung der roten Blutzellen bewirkte im Versuch II für Vollblutkonserven und Erythrozytenkonzentrat-1 eine Erhöhung der Hämatokritwerte. Dieses Ergebnis überrascht nicht, weil der Hämatokrit außer von der Erythrozytenzahl auch vom Volumen der roten Blutzellen abhängt. Die Zunahme der MCV-Werte signalisiert in unseren Untersuchungen - anders als unter in-vivo-Bedingungen - sehr wahrscheinlich eine Funktionsbeeinträchtigung der Erythrozyten. Bekanntlich wird das Volumen einer Zelle entscheidend von der Tätigkeit der membranalen Na⁺-K⁺-ATPase und der Aufrechterhaltung physiologischer extra-/intrazellulärer Ionengradienten geprägt (Greger 1994). Bei Energiemangel mit verminderter Funktion der Na⁺-K⁺-Pumpe kommt es zu intrazellulärer Kaliumverminderung und Depolarisation. Die nachfolgende Neuverteilung der intra- und extrazellulären Elektrolyte erhöht die intrazelluläre Osmolalität und führt zum Wasserein-

strom. Die in unseren Untersuchungen beobachtete Abnahme des extrazellulären Natriumgehaltes, verbunden mit einem Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration (Abb. 7) deutet

auf eine Verminderung der Na⁺-K⁺-ATPase-Aktivität in den Membranen der gelagerten Erythrozyten hin. Bei der 4°C-Aufbewahrung fiel auf, dass es in den chloridarmen Erythrozyten-

Tab. 4: Korrelationskoeffizient (r) für die Parameter pH, 2,3-DPG, ATP, p50, K⁺-Ionen und Hämolyserate in Konserven mit Vollblut oder Erythrozytenkonzentrat. Irrtumswahrscheinlichkeit: * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001.

Correlation coefficient (r) of the parameters pH, 2,3-DPG, ATP, p50, potassium ions and rate of hemolysis in units of full blood or erythrocyte concentrates. Error probability: * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001.

| Konserve | | | pH | 2,3-DPG | p50 | K ⁺ -Ionen | ATP |
|-----------------------|--------------------------|-----------------------|----------|----------|---------|-----------------------|-------|
| Lagertemperatur: 22°C | Vollblut | 2,3-DPG | -0,18 | | | | |
| | | p50 | -0,35* | -0,22 | | | |
| | | K ⁺ -Ionen | -0,69*** | 0,07 | -0,31* | | |
| | | Hämolyserate | -0,52*** | -0,04 | 0,00 | 0,40** | - |
| | Erythrozytenkonzentrat-1 | 2,3-DPG | 0,27 | | | | |
| | | p50 | -0,64*** | -0,27 | | | |
| | | K ⁺ -Ionen | -0,59*** | 0,10 | -0,47** | | |
| | | Hämolyserate | 0,19 | 0,22 | -0,49** | 0,11 | - |
| | Erythrozytenkonzentrat-2 | 2,3-DPG | 0,39 | | | | |
| | | p50 | 0,04 | 0,02 | | | |
| | | K ⁺ -Ionen | -0,80*** | -0,26 | 0,20 | | |
| | | Hämolyserate | 0,34 | 0,38 | -0,12 | 0,25 | - |
| Lagertemperatur: 4°C | Vollblut | 2,3-DPG | 0,52*** | | | | |
| | | p50 | 0,00 | 0,19 | | | |
| | | ATP | -0,39** | 0,00 | 0,05 | | |
| | | K ⁺ -Ionen | -0,62*** | -0,66*** | 0,16 | | |
| | | Hämolyserate | -0,57*** | -0,55*** | -0,05 | 0,67*** | -0,06 |
| | Erythrozytenkonzentrat-1 | 2,3-DPG | 0,45** | | | | |
| | | p50 | -0,69*** | 0,01 | | | |
| | | ATP | -0,54*** | -0,10 | 0,40** | | |
| | | K ⁺ -Ionen | -0,77*** | -0,61*** | 0,26* | | |
| | | Hämolyserate | -0,42** | -0,64*** | -0,07 | 0,63*** | 0,21 |
| | Erythrozytenkonzentrat-2 | 2,3-DPG | 0,41** | | | | |
| | | p50 | -0,59*** | 0,51** | | | |
| ATP | | -0,86*** | 0,63*** | 0,85*** | | | |
| K ⁺ -Ionen | | 0,29 | -0,42** | 0,13 | | | |
| Hämolyserate | | 0,19 | -0,28 | -0,01 | 0,65*** | 0,13 | |

konzentrat-2 erst ab der dritten Versuchswoche zu einer durchschnittlichen Volumenzunahme der roten Blutzellen kam (Abb. 5). Insgesamt blieben die beobachteten Veränderungen der erythrozytären Indizes in den Konserven meistens innerhalb der für diese Werte beim Pferd angegebenen Referenzbereiche.

Die Annahme, dass lagerungsbedingte membranale Funktionsstörungen der Blutzellen auftraten, wird auch durch die veränderten Werte der osmotischen Resistenz gestützt. So fanden wir eine signifikante Abnahme der minimalen und maximalen Fragilität der roten Blutzellen während der 5-wöchigen Lagerung (Versuch II) bei den Konserven Vollblut und Erythrozytenkonzentrat-1. Im Unterschied dazu blieben die gleichen Werte im Erythrozytenkonzentrat-2 ohne statistisch nachweisbare Änderungen. Inwieweit diese funktionelle Instabilität der Erythrozyten nach einer Transfusion der Konserve im Empfängerorganismus wieder reversibel ist, kann durch die vorliegenden Untersuchungen nicht entschieden werden.

Der in Zellen ablaufende Stoffwechsel wird wesentlich vom existierenden pH beeinflusst. Diese Aussage konnten wir durch Ermittlung signifikanter Korrelationskoeffizienten zwischen pH-Wert und verschiedenen Vitalitätsparametern der Blutzellen bestätigen (Tab. 4). Während der Lagerung von Blutkonserven ist infolge anaerober Metabolisierung im geschlossenen System mit einem Absinken des pH-Wertes zu rechnen. Tatsächlich fanden wir für die Konserven Vollblut und Erythrozytenkonzentrat-1 eine zunehmende Säuerung (Abb. 2 und 6). Im Erythrozytenkonzentrat-2 wurden die Blutzellen mit chloridfreier GM-Lösung gewaschen und in der gleichen Lösung resuspendiert. Die Depletion von Cl⁻-Ionen aus dem geschlossenen System einer Blutkonserve wirkt sich auf den pH-Wert aus. Bekanntlich zählt Chlorid zu den starken Säureanionen. Seine zunächst extrazelluläre Entfernung (Waschvorgang mit chloridfreier Lösung) führt zum erhöhten Flux der Cl⁻-Ionen entlang des Konzentrationsgradienten von intra- nach extrazellulär. Ein zweiter Waschvorgang entfernt auch diese Cl⁻-Ionen. Das Ausmaß der von uns durchgeführten Chloriddepletion im Erythrozytenkonzentrat-2 wird durch den Abfall des Chloridgehaltes unter die Nachweisgrenze deutlich. Zum Erhalt der Elektroneutralität werden die entfernten Cl⁻-Ionen durch Einstrom anderer („schwächerer“) Anionen, wie Hydroxylionen, in die Zelle ersetzt (=Chlorid-Shift-Phänomen, s. *Minakami et al. 1975, Matthes 1994*). Als Resultat dieser Vorgänge steigt der pH bzw. sein lagerungsbedingter Abfall in den Konserven wird minimiert oder vollständig verhindert. Die Befunde auf den Abbildungen 2 und 6 lassen erkennen, dass uns dieses Vorhaben entweder teilweise (Versuch I: ersten 2 d) oder vollständig (Versuch II: pH-Werte unterschreiten nicht das Ausgangsniveau) gelang.

Die Transfusion von Erythrozyten geschieht mit dem Ziel, im Empfängerorganismus die Sauerstofftransportfunktion des Blutes zu verbessern. Die Oxygenierung des Sauerstoffs an Hämoglobin wird bei gegebenem O₂-Partialdruck von verschiedenen Faktoren, wie H⁺-Ionen, 2,3-DPG u.a., bestimmt (Bohreffekt). Der Protonenanstieg (= ↓pH) müsste mit einem Rechtsdrift der Kurve (↑p50) einhergehen. Eine negative Korrelation zwischen pH- und p50-Werten konnte wiederholt nachgewiesen werden (s. Tab. 4). Da es sich bei Blutkonserven in der Regel nicht um ein absolut geschlossenes System handelt, werden die Werte des Oxy-Hb außer vom Milieu der Suspension von der Gas-

durchlässigkeit der Blutbeutel sowie der zwischenzeitlichen Sauerstoffzufuhr (Anstechen der Blutkonserven während der Probenentnahmen, Waschvorgang in den Erythrozytenkonzentrat-2) verändert. Vermutlich bedingt durch diese äußeren Einflüsse kam es mit Ausnahme der Vollblutkonserven im Versuch I zu einem Anstieg des oxygenierten Hämoglobins (s. Abb. 2 und 6).

Um die Stoffwechselaktivität der roten Blutzellen einzuschätzen, wurden Glucose und Lactat als Metabolite der Glykolysekette herangezogen. In der Regel entstehen im Hauptweg dieses Zyklus, dem Embden-Meyerhof-Weg (EMP), aus 1 mol Glucose 2 mol Lactat. Zwei Nebenwege der Glykolyse können diese Laktatausbeute mindern. Zum einen geht ein Teil des Substrates ab dem zweiten Schritt des Stoffwechselweges in den Pentose-Phosphat-Zyklus (PPP) ein. Zum anderen zweigt in Höhe des 1,3-Diphosphoglycerats der 2,3-Diphosphoglycerat-Weg (DPG-P) ab (genaue Übersicht s. *Barthel 1999*). Im allgemeinen beträgt für domestizierte Säugetiere und den Menschen die Glukoseumsatzrate im PPP zwischen 5 und 10%. Eine Ausnahme bildet in dieser Hinsicht das Pferd. Bei dieser Tierart umfasst der PPP 12-13% des Gesamtumsatzes der erythrozytären Glykolyse (*Kaneko 1974; Kaneko 1975; Franken et al. 1977*). Infolge dessen ist in Pferdeblutkonserven zu erwarten, dass der Laktatgehalt parallel zum Absinken der Glukosekonzentration im Verhältnis von 1,7 : 1 ansteigt. Diesen Vorstellungen entsprachen in unseren Untersuchungen ausschließlich die gelagerten Vollblutkonserven. In den Erythrozytenkonzentrat-1 und -2 kam es zu einer Akkumulation des Lactats im Verhältnis zur Glucose von 2,3 bzw. 1,9 : 1 (22°C) sowie 2,6 bzw. 3,6 : 1 (4°C). Offenbar müssen in diesen Fällen für die erythrozytäre Laktatbildung außer der Glucose noch weitere Substrate herangezogen worden sein.

Im Verlauf der Glykolyse wird im DPG-P das Substrat 2,3-DPG gebildet. Aufgrund seiner räumlichen Anordnung zwischen den Ketten des Hämoglobinmoleküls korreliert die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins negativ mit der 2,3-DPG-Konzentration im Erythrozyten (*Benesch und Benesch 1967, Garby et al. 1969*). Des weiteren fungiert das 2,3-DPG als Energiereserve im Glukosestoffwechsel. Bildung und Metabolisierung des 2,3-DPG verlaufen in Abhängigkeit vom pH-Wert (s. *Barthel 1999*). Im Versuch II konnte anhand der Erythrozytenkonzentrate-2 eindrucksvoll nachgewiesen werden, dass bei einer annähernden Aufrechterhaltung des pH-Ausgangsniveaus und durch die selektive intrazelluläre pH-Erhöhung durch den Chlorid-Ionen-Shift eine Abnahme der intrazellulären 2,3-DPG-Konzentration gemindert wird. Ein signifikanter Einfluss des 2,3-DPG auf die Werte des p50 konnte demgegenüber in den Blutkonserven kaum nachgewiesen werden (s. auch Tab. 4). Möglicherweise überlagerten die anderen Faktoren des Bohreffektes, wie Temperaturveränderung und H⁺-Ionen, in den untersuchten Pferdeblutkonserven die Beziehung zwischen ↑2,3-DPG-Konzentration und ↑p50-Werten (=Rechtsdrift der O₂-Bindungskurve).

Die ATP-Konzentration der untersuchten Konserven (ausschließlich Versuch II) zeigte im Verlauf der Lagerung große Schwankungen. Sie erreichte in allen drei Additivlösungen Höchstwerte in der 3. und 4. Lagerungswoche. Die ATP-liefernden Schritte der Glykolysekette sind stark vom pH-Wert abhängig. Die im sauren Bereich auftretende Enzymhemmung von Phosphofruktokinase und Hexokinase ziehen eine verminderte ATP-Bereitstellung nach

sich. In Humanblutkonserven wurden vergleichsweise deutlich stärkere pH-Wert-Absenkungen als in unseren Pferdeblutkonserven gefunden (Dawson et al. 1970; Akerblom und Kreuger 1975; Messeter et al. 1977; Herve et al. 1980; Beutler und West 1983; Sandhagen et al. 1988; Seidl et al. 1991). Dieser Umstand könnte die weitgehend ausbleibende Veränderung der durchschnittlichen erythrozytären ATP-Konzentration in den von uns untersuchten Pferdeblutkonserven erklären. Außerdem bewirkt der höhere Anteil des Pentose-Phosphatzyklus am Gesamtglukoseumsatz im Pferdeerythrozyten eine Umgehung der ATP-verbrauchenden Schritte der Glykolyse, so dass sogar eine geringfügige Akkumulation dieses energiereichen Phosphates in den untersuchten Konserven möglich wurde (s. Barthel 1999).

Rückschlüsse auf einen verringerten Durchlasswiderstand der erythrozytären Zellmembran (=Permeabilitätsveränderung) sowie eine stärker werdende Hämolyse lassen sich aus den extrazellulären Konzentrationen solcher Parameter ziehen, die physiologisch einen hohen intra-/extrazellulären Konzentrationsgradienten aufweisen, z.B. LDH, K⁺-Ionen, Hämoglobin. In allen Blutkonserven war während der Lagerung eine zunehmende Aktivität für LDH nachweisbar. Die Nettobewegung dieses Enzyms in den extrazellulären Raum unterstützt die Annahme sinkender Membranintegrität der roten Blutzellen oder zunehmender Hämolyse bei fortschreitender Lagerung. Ebenso signalisiert der extrazelluläre Konzentrationsanstieg für K⁺-Ionen in den gelagerten Blutkonserven relativ frühzeitig membranale Imbalancen (\downarrow Na⁺-K⁺-ATPase) bzw. Hämolyse. Die höchsten extrazellulären Werte für Kalium und LDH bzw. die stärksten Abweichungen vom Ausgangsbefund wurden in den Erythrozytenkonzentrat-2 beobachtet. Im Versuch II nahm parallel dazu die extrazelluläre Hämoglobinkonzentration in diesen Blutkonserven zu und erreichte nach 36 Tagen Lagerung nicht mehr zu tolerierende Werte ($Me_{0,d}=6,5$ und $Me_{36,d}=305,2$ g/l). Während der nur 4-tägigen Lagerung bei 22°C war der extrazelluläre Hämoglobingehalt in den gleich behandelten Konserven mit $Me_{0,d}=5,8$ und $Me_{4,d}=7,8$ g/l nicht auffällig erhöht.

Hinweise für Konservierung und Transfusion

Die Lagerung der Pferdeblutkonserven führte zwar zu nachweisbaren Veränderungen erythrozytärer Parameter, ihre Transfundierbarkeit blieb jedoch in den meisten Fällen erhalten.

Die Vollblutkonserven und das Erythrozytenkonzentrat-1 waren sowohl nach 4-tägiger Konservierung bei 22°C als auch nach 5-wöchiger Aufbewahrung bei 4°C infolge niedriger Hämolyserate relativ gut für eine Transfusion geeignet. Die Veränderungen der roten Blutzellen im Erythrozytenkonzentrat-1 fielen dabei insgesamt geringer aus als im Vollblut. Besteht die Möglichkeit zur Trennung der Blutfraktionen, kann als Additivlösung für Erythrozytenkonzentrate das SAG-M empfohlen werden.

Bei der 22°C-Lagerung erreichten am 4. Untersuchungstag die K⁺-Konzentrationen im Erythrozytenkonzentrat-2 nicht mehr zu tolerierende Werte von >50 mmol/l. Die Transfusion von 1 Liter eines solchen Erythrozytenkonzentrates mit 50 mmol K⁺-Ionen würde bei einem Pferd mit 500 kg KM (~25 l Plasma) zum potentiellen Anstieg der Plasmakaliumkonzentration um ~2 mmol/l führen. Eine lebensgefährliche Hyperkaliämie (>10 mmol/l) wird

damit bei einem Rezipienten mit physiologischem Plasmakaliumgehalt im allgemeinen nicht verursacht, kann aber nicht vollständig ausgeschlossen werden. Zudem ist aufgrund der für den Konserveninhalt stattfindenden Temperaturerhöhung auf 38°C mit einem posttransfusionellen Rücktransport der Kaliumionen in den Intrazellulärraum zu rechnen. Jedoch gilt es, diese Annahme beim Pferd in vivo zu beweisen. Auffällig war bei der 4-tägigen Lagerung in den Erythrozytenkonzentrat-2 weiterhin eine rapide Absenkung der Sauerstoffbeladung des Hämoglobins zwischen 3. und 4. d der Aufbewahrung (s. Abb. 2, unten) sowie eine auffällige Streuung der Einzelwerte vieler Parameter. Vermutlich sind diese Befunde mit einer Folge von unterschiedlich intensiver Irritation der Blutzellen im Verlauf des Waschvorganges. Außerdem ist anzunehmen, dass mit Zugabe von nur 50 ml Additivlösung die notwendige Menge an Stabilisatorlösung nicht erreicht wurde. Insgesamt kann eingeschätzt werden, dass die von uns untersuchten chloridarmen Erythrozytenkonzentrate-2 nach einer 3-tägigen Lagerung bei 22°C noch zur Transfusion geeignet sind. Die Befunde der 22°C-Lagerung rechtfertigen jedoch nicht den aufwendigen Waschvorgang im Erythrozytenkonzentrat-2. Am günstigsten ist unter den Bedingungen der Lagerung bei Zimmertemperatur die Aufbewahrung von Pferdeerythrozyten in SAG-M-Stabilisator (Erythrozytenkonzentrat-1) zu bewerten.

Während der 4-tägigen Lagerung bei Zimmertemperatur verhielten sich die meisten Parameter im „gewaschenen“ und chloridarm aufbewahrten Erythrozytenkonzentrat-2 ähnlich denen im „unbehandelten“ Erythrozytenkonzentrat-1. Während der 5-wöchigen Lagerung bei 4°C konnten im Erythrozytenkonzentrat-2 bezüglich Zellvitalität vorteilhafte Verläufe der Werte für pH, 2,3-DPG, oxygeniertes Hämoglobin und osmotische Fragilität beobachtet werden. Nachteilig stiegen in den gleichen Konserven die Indikatoren für die Hämolyse, wie extrazellulärer Kaliumgehalt und LDH-Aktivität, deutlich an. Bei der längerfristigen 4°C-Konservierung blieben die Kaliumkonzentrationen im Erythrozytenkonzentrat-2 innerhalb tolerierbarer Grenzen. Demgegenüber stieg in diesen Blutkonserven die Hämolyserate unverhältnismäßig an (s. Tab. 2) und übertraf am 36. Tag der Lagerung den in den Richtlinien der Bundesärztekammer für Humanmediziner gesetzten Grenzwert für die Transfundierbarkeit von Blutkonserven in Höhe von <0,80%. Daher sollte die GM-Lösung zur Konservierung von Pferdeerythrozytenkonzentrat-2 nur bei Lagerung ≤4 Wochen eingesetzt werden. Innerhalb dieser 4 Wochen war die GM-Lösung den anderen geprüften Stabilisatoren überlegen.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei in vitro-Untersuchungen an roten Blutzellen des Pferdes unterschiedlich intensive Lagereschäden während der Konservierung bei 22°C bzw. 4°C aufgezeigt. Inwieweit diese erythrozytären Funktionsänderungen nach Transfusion beim Rezipienten reversibel sind oder irreversibel bleiben, muss in anstehenden in vivo-Untersuchungen nachgewiesen werden.

Literatur

Anonym (1996): Richtlinien zur Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion, aufgestellt vom Wissenschaftlichen Beirat der Bundesärztekammer und vom Bundesgesundheitsamt, Neufassung 1996, Dtsch. Ärzteverlag Köln.

- Akerblom, O. and A. Kreuger (1975): Studies on Citrate-Phosphate-Dextrose (CPD) blood supplemented with Adenine. *Vox Sang.* 29, 90–100.
- Barth, G. (1990): Aufbau einer Blutbank für Hunde in einer tierexperimentellen Einrichtung. *Vet. Med. Diss.*, Berlin.
- Barthel, B. (1999): Funktionelle Veränderungen der roten Blutzellen während ihrer Lagerung in Konserven mit Vollblut oder Erythrozytenkonzentraten vom Pferd. *Vet. Med. Diss.*, Berlin.
- Benesch, R. and R. E. Benesch (1967): The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26, 162–167.
- Beutler, E. and C. West (1983): Storage of red cell concentrates in CPD-A2 for 42 and 49 days. *J. Lab. Clin. Med.* 102, 53–62.
- Dawson, R. B., Kochalaty, W. F. and J. L. Gray (1970): Hemoglobin function and 2,3-DPG levels of blood stored at 4° C in ACD and CPD pH effect. *Transfusion* 10, 299–304.
- Dietz, O. und E. Nagel (1959): Gewinnung, Konservierung und Übertragung von Vollblut bei Pferd, Rind, Schwein und Hund. *Mh. Vet.-Med.* 14, 649–659.
- Franken, P. and A. J. H. Schotman (1977): Studies on a number of erythrocytic enzymes and intermediate products of equine erythrocyte metabolism. *Tijdschr. Diergeneesk.* 102, 1197–1203.
- Garby, L., Gerber, G. and C. H. De Verdier (1969): Finding of 2,3-DPG and ATP to human hemoglobin A. *Eur. J. Biochem.* 10, 110–115.
- Greger, R. (1994): Die Zelle als Grundbaustein. In: *Lehrbuch der Physiologie* (Hrsg.: R. Klinke, St. Silbernagl). Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York, 13–37.
- Grünbaum, E.-G. (1993): Bluttransfusion und Infusionstherapie. In: *Klinik der Hundekrankheiten* (Hrsg.: Freudiger, U., Grünbaum, E.-G., Schimke, E.). Gustav Fischer Verlag, Jena-Stuttgart, 175–184.
- Hartmann, H. und R. Staufenbiel (1995): Flüssigkeitstherapie bei Tieren. Gustav Fischer Verlag, Jena-Stuttgart, 95–98.
- Herve, P., Lamy, A., Peters, A., Toubin, M. and A. C. Bidet (1980): Preservation of human erythrocytes in the liquid state: Biological results with a new medium. *Vox Sang.* 39, 195–204.
- Hunt, E. and J. S. Moore (1990): Use of blood and blood products. In: *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 6, 133–147.
- Kaneko, J. J. (1974): Comparative erythrocyte metabolism. *Advances in veterinary science and comparative medicine.* 18, 117–153.
- Kaneko, J. J. (1975): Overall comparative erythrocyte metabolism. In: *Proceedings of the First International Symposium of Equine Hematology.* Am. Ass. of Equine Prac. Golden, Colo, 48–62.
- Komarek, J. und Sova, Z. (1963): Veränderungen an Blutkonserven von Rindern, Pferden und Hunden während der Lagerung. *Arch. Exper. Vet. Med.* 17, 819–825.
- Matthes, G. (1993): 15-Wochen-Lagerung von roten Blutzellen in chloridfreien Lösungen. In: *Eigenbluttransfusion.* (Hrsg.: W. Mempel, M. Mempel, M. U. Heim, G. Schwarzfischer), Taufkirchen, Sympomed, 1993, vol. 3, pp 44–49.
- McClure, J. J. (1990): Immunologic Disorders. In: *Large Animal Internal Medicine.* (Ed. Smith, B. P.). C. V. Mosby Comp., St. Louis, 1598–1625.
- Messeiter, L., Ugander, L., Monti, M., Lundh, B. and B. Löw (1977): CPD-Adenine as a blood-preservative-studies in vitro and in vivo. *Transfusion* 17, 210–217.
- Michell, A. R., Bywater, R. J., Clarke, K. W., Hall, L. W. and A. E. Waterman (1989): *Veterinary fluid therapy.* Blackwell, Oxford, 149–165.
- Minakami, S., Tomoda, A. and S. Tsuda (1975): Effect of intracellular pH (pHi) change on red cell glycolysis. In: *Erythrocyte Structure and Function* (Ed. Brewer, G. J.). New York, 1, 209–213.
- Morris, D. D. (1995): The haemolytic system. In: *The Equine Manual* (Eds. Higgins, A. J., Wright, I. M.). Saunders Company, London, Philadelphia, 449–451.
- Muto, S. (1983): Untersuchungen über das Verhalten von Erythrozytenzahl, Hämatokritwert, Kaliumgehalt, Hämoglobingehalt, pH-Wert und Bakteriengehalt in Blutkonserven vom Hund. *Vet. Med. Diss.*, Gießen.
- Nolte, I. (1986): Untersuchungen zur Lagerfähigkeit von Blutkonserven des Hundes unter besonderer Berücksichtigung der Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren. *Vet. Med. Habil.-Schrift*, Gießen.
- Nolte, I. (1988): Konservierung von Vollblut des Hundes für Transfusionszwecke in CPDA-1 Stabilisator beschicktem PVC-Beutel - Einfluß der Lagerung auf den Erhalt von Erythrozyten und Gesamteiweiß. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 101, 37–43.
- Nolte, I., Niemann, C. und G. Müller-Berghaus (1988): Konservierung von Vollblut des Hundes für Transfusionszwecke in CPDA-1 Stabilisator beschicktem PVC-Beutel - Einfluß der Lagerung auf den Erhalt der plasmatischen Gerinnungsfaktoren. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 101, 73–76.
- Price, G. S., Armstrong, P. J., McLeod, D. A., Babineau, C. A., Metcalf, M. R. and L. C. Sellett (1988): Evaluation of citrate-phosphate-dextrose-adenine as a storage medium for packed canine erythrocytes. *J. Vet. Int. Med.* 2, 126–132.
- Sachs, L. (1978): *Angewandte Statistik.* Springer Verlag, Berlin, 190–193.
- Sandhagen, B., Högman, C. F., De Verdier, C.-H. and L. Eriksson (1988): Distribution of blood gases, glucose and lactate within stored blood units. *Vox Sang.* 55, 139–142.
- Scott, A. M. and L. B. Jeffcott (1978): Haemolytic disease of the newborn foal. *Vet. Rec.* 103, 71–74.
- Seidl, S., Gosda, W. and A. J. Reppucci (1991): The in vitro and in vivo evaluation of whole blood and red cell concentrates drawn on CPDA-1 and stored in a NON-DEHP plasticized PVC container. *Vox Sang.* 61, 8–13.
- Sommer, B. (1993): Lagerungsbedingte hämatologische Veränderungen in Katzenblutkonserven und Ergebnisse der Transfusion. *Vet. Med. Diss.*, Hannover.
- Vaala, W. E. (1990): Transfusion Therapy. In: *Equine Clinical Neonatology* (Eds. Koterba, A. M., Drummond, W. H., Kosch, P. C.). Lea & Febiger, Philadelphia, 701–704.
- Wardrop, K. J., Tucker, R. L. and K. Mugnai (1997): Evaluation of canine red blood cells stored in a saline, adenine and glucose solution for 35 days. *J. Vet. Int. Med.* 11, 5–8.

Danksagung

Für die freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung unserer Befunde bedanken wir uns sehr bei Frau Dr. G. Arndt, Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung, FU Berlin.

Univ.-Prof. Dr. H. Hartmann

Institut für Veterinär-Physiologie
 Fachbereich Veterinärmedizin
 Freie Universität
 Oertzenweg 19b
 14163 Berlin

Tel. 030/ 8108 2586

Fax 030/ 8108 2610

e-mail hehart@vetmed.fu-berlin.de