Aus der Abteilung für Medizinische Biochemie des Instituts für Physiologische Chemie der Universität Hamburg Direktor (ehem.): Priv.-Doz. Dr. med. E. E. Gabbe

und

der Abteilung für Transfusionsmedizin und Transplantationsimmunologie der Chirurgischen Universitäts- und Poliklinik Hamburg-Eppendorf Direktor: Prof. Dr. med. P. Kühnl

Kernspin-Resonanz-Untersuchungen an gelagerten Erythrozytenkonzentraten

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von CHRISTIAN BLECKMANN aus HAMBURG

Hamburg, 1999

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung1					
	1.1 Die Transfusion von gelagerten Erythrozytenkonzentraten		Transfusion von gelagerten Erythrozytenkonzentraten	1		
	1.2	ılitätskontrolle von Erythrozytenkonzentraten	1			
	1.3 Der Erythrozyt und Alterung von Erythrozytenkonzentraten					
	1.4	Die Qua	Kernspin-Resonanz-Untersuchung als neue Methode in der litätskontrolle von Erythrozytenkonzentraten?			
	1.5 Problemstellung und Ziel der Arbeit		olemstellung und Ziel der Arbeit	12		
2	Material und Methoden13					
	2.1 Aufarbeitung der untersuchten Erythrozytenkonzentrate		13			
	2.2	.2 Kernspin-Resonanz-Untersuchung (KSR)				
	2.3	3 Malondialdehydbestimmung (MDA)				
	2.4	2.4 Bestimmung hämatologischer Parameter				
	2.5	2.5 Statistische Methoden				
3	Ergebnisse 19					
	3.1	3.1 Kernspin-Resonanz-Untersuchungen		19		
		3.1.1	Untersuchung an regulär gelagerten Erythrozytenkonzentraten	19		
		3.1.2	Einfluß von Präparationsänderungen auf die KSR-Ergebnisse	22		
		3.1.3	Provokation oxidativer Prozesse durch Wasserstoffperoxid	24		
	3.2	3.2 Malondialdehydkonzentration in der Additivlösung PAGGS-M		26		
	3.3	3.3 Hämatologische Parameter		27		
4	Disk	cussio	n	30		
	4.1	Ker	nspin-Resonanz-Untersuchungen im Vergleich zu den			
		Mal	ondialdehydbestimmungen			

	4.3	Weitere mögliche Einflußgrößen auf die Ergebnisse der Kernspin- Resonanz-Untersuchungen	
5	Zusar	nmenfassung 37	
6	Litera	aturverzeichnis 39	
7	Anhang		
	7.1	Grundlagen der Kernspin-Resonanz	
	7.2	Additiv- und Stabilisatorlösungen	
	7.3	Einzelergebnisse der MDA-Bestimmungen	
	7.4	Einzelergebnisse der Kernspin-Resonanz-Untersuchungen53	
	7.5	Einzelergebnisse der hämatologischen Parameter	
8	Leber	nslauf	
9	Dank	sagung	

1 Einleitung

1.1 Die Transfusion von gelagerten Erythrozytenkonzentraten

Bei der Behandlung transfusionspflichtiger Erkrankungen haben sich spezielle Blutkomponenten im klinischen Alltag durchgesetzt. Die Separation von Vollblut in Erythrozytenkonzentrat, Plasma sowie gegebenenfalls Thrombozytenkonzentrat ist gegenwärtiger Standard, da wichtige Bestandteile wie Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten während der Vollblutlagerung nach kurzer Zeit funktionell inaktiv werden. Die Lagerung von Erythrozyten erfolgt heute in der transfusionsmedizinischen Routine bei einer Temperatur von 4°C (± 2°C) als Erythrozytenkonzentrat in additiver "Schutz- und Nährlösung". Während der letzten 50 Jahre wurden verschiedene Nährlösungen zur Erythrozytenkonservierung untersucht, um die Lagerungszeit zu verlängern und um eine bessere Verfügbarkeit der Blutprodukte zu gewährleisten (näheres s. Anhang "Additivund Stabilisatorlösungen", Abschnitt 7.2). Im Universitäts-Krankenhaus Eppendorf kommt u. a. routinemäßig die Additivlösung PAGGS-M (phosphate, adenine, guanosine, glucose, sodium, mannitol) zur Anwendung. Hierbei handelt es sich um eine hochwertige Nährlösung [8, 79 91, 121], die eine maximal zulässige Lagerungszeit des Erythrozytenkonzentrates von 49 Tagen erlaubt [91, 112].

Die Vorgänge bei der Lagerung von Erythrozytenkonzentraten sind komplex und durch einzelne Parametern schwer zu erfassen. Entscheidend ist die Erythrozytenvitalität im Empfänger. Eine unspezifische Methode wie die Kernspinresonanz, die viele Vorgänge auf einmal erfaßt, hätte hier einen praktischen Vorteil, insbesondere wenn sie schnell die Qualität größerer Mengen an Erythrozytenkonzentraten zerstörungsfrei überprüfen könnte.

1.2 Qualitätskontrolle von Erythrozytenkonzentraten

Der wichtigste Parameter, an dem die Güte der Lagerung von roten Blutzellen gemessen werden kann, ist der Verbleib der Erythrozyten im Rezipienten nach Transfusion (Bestimmung durch Markierung der Erythrozyten mit verschiedenen Radioisotopen [61, 90]). Als Maß wird der Prozentsatz der Erythrozyten angegeben, der für mindestens 24 Stunden nach Transfusion im Empfängerkreislauf verweilt. Bei großer interindividueller Variabilität verlangen die derzeit gültigen Regelungen über Konservierungslösungen und Lagerbedingungen, daß mindestens 70% der transfundierten Zellen nach 24 Stunden im Empfängerorganismus nachweisbar sein müssen [117]. Bei der Verwendung von PAGGS-M als Additivlösung genügen gelagerte Erythrozyten dieser Anforderung bis maximal 49 Tage [112].

Auf der Suche nach geeigneten *in vitro* Methoden, die eine Aussage über die Erythrozytenüberlebenszeit *in vivo* und somit über die Qualität des Blutproduktes machen können, wurde eine große Anzahl hämatologischer und biochemischer Parameter überprüft, wie z. B. die intraerythrozytäre 2,3-Bisphosphoglycerat-(2,3-BPG)-Konzentration [80, 85] und die Adenosintriphosphat-(ATP)-Konzentration. Als zumindest unter praktischen Gesichtspunkten nicht geeignet in der Qualitätskontrolle erwiesen sich morphologische Veränderungen, die Bestimmung des Kaliums und der osmotischen Resistenz der Erythrozyten [84].

Besondere Beachtung in der Qualitätskontrolle gilt der Fähigkeit der Aufrechterhaltung der intraerythrozytären 2,3-Bisphosphoglycerat-(2,3-BPG)-Konzentration [85]. 2,3-BPG ist ein Nebenprodukt der Glykolyse, liegt im Erythrozyten in verhältnismäßig hoher Konzentration vor (4-5 mmol/l) und hat eine wichtige Funktion bei der Regulierung des Sauerstofftransportes. Das deoxygenierte Hämoglobin vermag ein Molekül 2,3-BPG zu binden; durch Wechselwirkung der negativ geladenen Phosphat-Gruppen mit positiv geladenen Gruppen von Lysin und Histidin wird die Raumstruktur des Hämoglobin so verändert, daß die Sauerstoffaffinität sinkt und der Sauerstoff somit peripher leichter abgegeben werden kann.

Bei der Lagerung in PAGGS-M kommt es innerhalb von 3 Wochen zu einem Abfall der zellulären 2,3-BPG-Konzentration auf etwa ein Fünftel des Ausgangswertes [90]. Es resultiert eine Linksverschiebung der Sauerstoffbindungskurve als Ausdruck einer verringerten Sauerstoff-Abgabefähigkeit des Erythrozyten [14, 83]. Inkubationsversuche mit Sauerstoff belegten, daß es unter physiologischen Bedingungen zu einer Regeneration des 2,3-BPG kommt. Diese Regenerationsfähigkeit bleibt während der 7wöchigen Lagerung nahezu unverändert [90]. In vivo Untersuchungen belegen, daß es nach Transfusion innerhalb weniger Stunden zu einer Restitution des ATP-Gehaltes der Erythrozyten kommt, es jedoch bis zu 48 Stunden nach Transfusion dauert, bis es zu einer kompletten Resynthese des 2,3-BPG gekommen ist [81, 82]. Mollison et al. [83] beobachteten eine Posttransfusionsüberlebensrate von unter 70% trotz hoher ATP-Konzentrationen. Bei niedriger ATP-Konzentration und gleichzeitig hohem 2,3-BPG-Gehalt betrug die Überlebensrate 87%, selbst nach 42 Tagen Lagerung. Heaton et al. bestätigten den engen Zusammenhang zwischen der Restitution der Erythrozytenfunktion und dem zellulärem 2,3-BPG-Gehalt im Gegensatz zur Konzentration an ATP [24, 61]. Es ist davon auszugehen, daß ein erniedrigter 2,3-BPG-Spiegel in den ersten Stunden nach Transfusion unter kritischen Bedingungen unerwünscht zum Tragen kommen kann [81].

Als substantielle Veränderungen der Erythrozyten während der Lagerung werden vor allem Änderungen der Zellmembran beschrieben. Hierzu zählen eine veränderte Zusammensetzung und Organisation der Membranlipide und –proteine [5]. Schäden an der Zellmembran gelten als Hauptursache für eine reduzierte Erythrozytenvitalität nach Lagerung [23]. Ein zuverlässiges Kriterium für einen Qualitätsverlust scheint eine reduzierte Verformbarkeit der Erythrozyten zu sein [21,22,86,118], deren Bestimmung jedoch Forschungseinrichtungen vorbehalten bleibt.

1.3 Der Erythrozyt und Alterung von Erythrozytenkonzentraten

Die wichtigste Funktion der Erythrozyten, der zur Versorgung des Gewebes bis in die kleinsten Gefäßbezirke erforderliche Transport von Sauerstoff, sowie der Rücktransport des entstandenen CO_2 , wird durch eine Reihe von biochemischen und strukturellen Besonderheiten gewährleistet. Der normale Erythrozyt besitzt eine hantelförmige Gestalt mit einem Durchmesser von 7,5-8,3 μ m und einer Dicke von 1,7 μ m. Die bikonkave Form gewährleistet eine gute Verformbarkeit der Erythrozyten die für die Blutviskosität von großer Bedeutung ist und eine Sequestration der Zellen, z. B. während der Passage durch die Milz, verhindert.

Für die mechanische Flexibilität ist die biochemische Zusammensetzung der Erythrozytenmembran entscheidend. Sie besteht überwiegend aus Glycerolipiden, die derart angeordnet sind, daß eine zweischichtige Lage mit hydrophilen Außenseiten und einem hydrophoben Inneren entsteht. Eingelagert in die Membran sind verschiedene Proteine, deren Funktionen beispielweise im transmembranösen Molekültransport (band-3-protein) oder in der Aufrechterhaltung der negativen Oberflächenladung des Erythrozyten (Proteine der Glycophoringruppe) bestehen. Auf der zytoplasmatischen Seite der Membran bilden andere Proteine wie Spectrin, Ankyrin und Actin ein Gerüst in Form eines Netzwerkes, welches als Zytoskelett bezeichnet wird und für die Funktion und Flexibilität der Membran von essentieller Bedeutung ist. So führt ein fehlerhaftes Spectrin beispielsweise zum Krankheitsbild der hereditären Sphärozytose [117]. Die Bewahrung der Integrität der Membran ist ein aktiver, ATP-abhängiger Prozeß. Entsprechend kann ein Glukosemangel wie bei hereditärem Glykolysedefekt (Pyruvatkinasemangel) zu Membrandefekten mit pathologischen Veränder-ungen der Erythrozytenform und zur Hämolyse führen [6]. Weitere energieabhängige Prozesse im Erythrozyten dienen der Stabilisierung des zweiwertigen Zustandes des Eisenions im Häm, der Aufrechterhaltung des transmembranösen Elektrolytgradientens und dem Erhalt der reduzierten Form der SH-Gruppen des Hämoglobins und der intrazellulären Enzyme. Da der reife Erythrozyt keine Mitochondrien enthält, ist sein Stoffwechsel durch anaerobe Glukoseverwertung gekennzeichnet, die vorwiegend durch direkte Glykolyse erfolgt. NADHP wird durch Glucoseoxidation über den Pentosephosphatweg bereitgestellt und dient u. a. dazu, Gluthation in reduziertem Zustand zu halten. Gluthation beseitigt H₂O₂ und reduziert SH-Gruppen von Hämoglobin, Enzymen und Membranproteinen und schützt diese vor Oxidation. Ist die Bildung von reduziertem Gluthation vermindert, wie z. B. beim Glukose-6-Phosphatdehydrogenasemangel, so kann es bei exogener Zufuhr von Peroxidbildnern zur Hämolyse kommen. NADH dient zur Reduktion der Methämoglobinreduktase, die ihrerseits Fe³⁺-Hämoglobin reduziert.

Die durchschnittliche Überlebenszeit normaler Erythrozyten beträgt 120 Tage. Der Abbau gealterter Erythrozyten vollzieht sich v. a. in Knochenmark, Leber und Milz. Daneben werden geschädigte Erythrozyten in Abhängigkeit vom Ausmaß ihrer morphologischen Veränderungen in der Milz und bei stärkeren Alterationen auch in der Leber sequestriert.

Während der Lagerung von Erythrozytenkonzentraten kann es zu einem Funktionsverlust der Erythrozytenmembran kommen. Seit langem ist ein Lipidverlust, verbunden mit einer Spheroechinozytose und dem Entstehen spectrinfreier Vesikel [86,118,39,65,50,77,98,111] bekannt. Die Abnahme an ATP während der Lagerung trägt zu Membranschäden bei, ist jedoch nicht hauptverantwortlich, da ein Verlust der Membranverformbarkeit auch bei hochnormalem ATP-Gehalt auftritt [23]. Als wichtiger irreversibler Schädigungsmechanismus wird bei gelagerten Blutprodukten die Peroxidation von Zellbestandteilen durch Radikale diskutiert [64, 71, 74, 75].

Im Erythrozyten entstehen die Sauerstoffradikale bei dem Fe²⁺-katalysiertem Abbau von H₂O₂ (s.u.). Alle drei Sauerstoffradikale sind an der Sauerstofftoxizität beteiligt, wobei das Hydroxylradikal das reaktivste ist. Die reaktiven Sauerstoffspezies schädigen Moleküle auf mannigfache Weise, z.B durch Schädigung der DNA oder durch Veränderungen von Proteinen und Kohlenhydraten [54-60]. Gut untersucht ist die Auswirkung oxidativer Schädigung auf Lipide, insbesondere Membranlipide. Hier sind es speziell die mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die in einer Reihe von charakteristischen, als Lipidperoxidation bezeichneten Reaktionen modifiziert werden. Neben der entscheidenden Beteiligung von Sauerstoffradikalen brachte man die Peroxidation von Membranlipiden mit einer Vielzahl toxischer Substanzen in Verbindung [20, 72, 100, 115, 119]. Eine gesteigerte Lipidperoxidation wurde auch bei verschiedenen Erkrankungen wie dem akuten Myokardinfarkt [3], der rheumatoiden Arthritis [66] und bösartigen Neubildungen [25, 56, 60] beobachtet. Eine erhöhte Empfindlichkeit roter Blutzellen gegenüber oxidativen Prozessen wurden bei hämolytischen Anämien [101, 103], der Thalassämia major und dem Glucose-6-phosphat-dehydrogenase-Mangel und der Sichelzellanämie [32] beschrieben. Darüber hinaus ließ sich die Lipidperoxidation beim Alterungsprozeß von Erythrozyten nachweisen [2, 29, 64, 71, 74, 75, 116].

Die Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren (Arachidonsäure, Linolensäure, Linolsäure) in Membranlipiden wird durch Reaktion mit Sauerstoffradikalen (Singlett-Sauerstoff oder freie Radikale) eingeleitet. Die ungepaarten Elektronen des atmosphärischen Sauerstoffs sind beim Singlett Sauerstoff ${}^{1}O_{2}$ zu einem reaktiven Dublett mit antiparallelem Spin gepaart. Singlett-Sauerstoff entsteht z. B. durch photodynamische Aktivierung. ${}^{1}O_{2}$ addiert sich an C-Atome von Doppelbindungen der Polyensäuren und führt zur Bildung von Hydroperoxiden.

Das hochreaktive Hydroxylradikal (OH*) entsteht bei der sog. Fenton-Reaktion (1) durch die Fe²⁺-katalysierte Disproportionierung von H_2O_2 [63, 92, 109, 113].

Fenton-Reaktion: $H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow OH^* + OH^- + Fe^{3+}$ (1)

Das Hydroxylradikal (OH*) ist maßgeblich an der Initialisierung der Lipidperoxidation beteiligt. Die Radikalgeneration im Erythrozyten ist in der Übersicht in Abb. 1 dargestellt. Substrate der Peroxidation sind u. a. ungesättigte Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen. Der Oxidationsprozeß ist eine Radikalkettenreaktion, die man in Initialisierung, Propagierung und Kettenabbruch einteilen kann. Das Radikal greift die Methylengruppe zwischen zwei Doppelbindungen einer Polyensäure an. Durch den Protonenabzug entsteht ein Polyensäureradikal. Das Lipidradikal seinerseits kann sich mit molekularem Sauerstoff zu einem Polyensäure-Peroxyradikal verbinden, das wiederum zur Bildung eines Lipidperoxids und eines neuen Lipidradikals führt. Auf diese Weise kommt es autokatalytisch zur Bildung von immer mehr Lipidperoxiden. Zum Abbruch dieser Kettenreaktion kommt es durch Erschöpfung der Reaktionspartner, Abfangen von Radikalen durch Antioxidantien oder durch die Reaktion zweier Radikale miteinander. Durch stufenweisen Polyensäureabbau entsteht ein komplexes Gemisch von Malondialdehyd, n-Alkanen, n-Alkanalen, Hydroxyalkanalen, 2-Alkenalen, Alka-2,4-dienalen, Hydroxyalkenalen und Ketonen [60].



Abb. 1: Schematische Darstellung der Radikalgeneration im Erythrozyten; Methämoglobinreduktase (Cytochrom b_5 -Reduktase) (1), Superoxid-dismutase (2), Katalase (3), Glutathionperoxidase (4)

Die Möglichkeit einer analytischen Erfassung der Lipidperoxidation geht auf eine Beobachtung zurück, daß 2-Thiobarbitursäure mit Gewebehomogenaten nach Luftinkubation, ungesättigten Fettsäuren und ihren Oxidationsprodukten eine Farbreaktion ergibt. Die Entdeckung, daß Malondialdehyd bei der Lipidperoxidation entsteht und die eigentliche, mit Thiobarbitursäure reagierende Substanz ist, waren für die Aufklärung des Mechanismus der Lipidperoxidation von großer Bedeutung.

Ein bekanntes Nachweisverfahren von MDA nutzt die Reaktion von MDA mit Thiobarbitursäure (TBA) zu einer chromophoren Substanz, die sich photometrisch nachweisen läßt und erstmals 1958 beschrieben wurde [96]. Aufgrund der Sensitivität der Methode und der einfachen Durchführbarkeit ist der TBA-Test die am weitesten verbreitete Nachweismethode der Lipidperoxidation [26, 35, 37]. Die Methode unterliegt jedoch einer Vielzahl störender Einflüsse und zeigt eine insgesamt schlechte Reproduzierbarkeit [68]. Der gemessene MDA-Gehalt gibt keine exakte Auskunft über Herkunft und Quantität der MDA-Prekursoren [68]. Die meisten der TBA-reaktiven Substanzen entstehen während der Nachweisreaktion, beim Erhitzen in saurem Milieu [52, 53, 63]. Desweiteren können auch solche Substanzen, die in keinem direkten Zusammenhang mit der Lipidperoxidation stehen, einen TBA-Komplex bilden. Hierzu zählen unter anderem Kohlenhydrate und Aminosäuren [55]. In diesem Zusammenhang sollte bei der Anwendung des TBA-Testes der Begriff der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) dem MDA vorgezogen werden [38]. Die Bestimmung der Malondialdehydkonzentration durch TBA-assays dient somit mehr als qualitative denn als quantitative Nachweismethode [60, 38, 68].

Die herausragende Rolle der Sauerstoffradikale und der Lipidperoxidation beim Alterungsprozeß von Erythrozyten wurde durch mehrere Arbeiten nachgewiesen [z. B. 2, 29, 64, 71, 73, 74]. Erythrozyten von Patienten mit Sichelzellanämie [62, 94] oder Fanconi-Anämie [93] wiesen eine verkürzte Lebensdauer auf und zeigten eine gesteigerte erythrozytäre Generation des Superoxid-Anions. Die hohe Sauerstoffspannung und die Anwesenheit von Eisen macht die Lipidmembran des roten Blutkörperchens besonders empfindlich gegenüber Peroxidation. Darüber hinaus produzieren Makrophagen und Granulozyten Wasserstoffperoxid und Superoxid-Anionen, die in den Extrazellulärraum diffundieren und die Lipidperoxidation der Erythrozyten propagieren können [26, 28, 114]. In vivo wirken im Erythrozyten die Enzyme Methämoglobinreduktase, Katalase und Glutathionperoxidase der Radikalgeneration entgegen (s. Abb. 1); verschiedene Antioxidantien wie Vitamin E und Vitamin C führen zu einer Inaktivierung der Radikale [9, 71]. Unter Lagerungsbedingungen kommt es jedoch zu einer Erschöpfung dieser Schutzmechanismen [5, 89]. So konnte in gealterten Erythrozyten eine verminderte Konzentration an reduziertem Glutathion und Tocopherol nachgewiesen werden [89]. Die Folge ist die unerwünschte Generation des hochreaktiven Hydroxylradikals. Dieses verursacht zum einen die Inaktivierung schützender Enzyme und zum anderen eine direkte Schädigung durch Zerstörung von Membranlipiden. Eine Resynthese defekter Zellbestandteile ist dem Erythrozyten als kernlose Zelle nicht möglich. Die "Reactive-Oxygen-Species" (ROS) sind auch für weitere Alterungsprozesse der Erythrozyten mitverantwortlich, wie Aggregation von Membranproteinen, herabgesetzte Membranfluidität, Zunahme der Membranpermeabilität für Kalium und Zunahme des IgG-Bindungsvermögens [6]. Der Erythrozyt ist nicht nur einem ständigen oxidativen Stress ausgesetzt, sondern mit zunehmendem Alter kommt es zudem zur Erschöpfung der Schutzmechanismen und zu einem Verlust von Radikalfängern wie Tocopherol und reduziertem Glutathion [89].

Auch bei Lagerung von Erythrozyten in additiver Lösung zu Transfusionszwecken zeigte sich eine gesteigerte Lipidperoxidation. Knight und Mitarbeiter bestimmten das Ausmaß der Lipidperoxidation während der Lagerung von Erythrozyten in verschiedenen Nährlösungen und unter Zusatz von Antioxidantien [71, 74, 75]. Der Nachweis von Abbauprodukten der Lipidperoxidation, z. B. des Malondialdehyds, dient als ein Qualitätsparameter in der Beurteilung der Güte einer Additivlösung [71, 74, 75], unterliegt jedoch einer Vielzahl störender Einflüsse und zeigt eine insgesamt schlechte Reproduzierbarkeit [68].

In der Qualitätskontrolle von Erythrozytenkonzentraten wäre eine Methode wünschenswert, die Lagerungsschäden zerstörungsfrei und frühzeitig nachweist, um auch Erythrozytenkonzentrate fortgeschrittener Lagerungszeit auf ihre Güte zu prüfen und somit die Bereithaltung hochwertiger Erythrozytenkonzentrate zu optimieren.

1.4 Die Kernspin-Resonanz-Untersuchung als neue Methode in der Qualitätskontrolle von Erythrozytenkonzentraten?

Die Kernspin-Resonanz-Methode (KSR, NMR) bietet eine Möglichkeit, Wechselwirkungen zwischen Molekülen und Atomen (Protonen) zerstörungsfrei zu untersuchen. NMR-Untersuchungen haben u. a. die Diffusion von Wasser durch die Erythrozytenmembran studiert [31, 46]. Dabei wurde der extrazelluläre (Plasma) Einfluß von Mangan (Mn²⁺) auf die Querrela-Wassermolekülen xation von diffundierenden untersucht. Spektroskopische NMR-Untersuchungen an Erythrozytenmembranen gingen hauptsächlich der Frage der biochemischen Umgebung der Protonen, d.h. der Lipid-Proton Wechselwirkung nach [95]. KSR-Untersuchungen an intakten Erythrozyten beschäftigten sich im wesentlichen mit dem Relaxationsverhalten von Vollblutproben, die bei Raumtemperatur bzw. bei 37 °C gelagert wurden, wobei Änderungen der Relaxationszeiten bereits frühzeitig nach Lagerungsbeginn auftraten [47]. Dabei wurde eine Abhängigkeit der Spin-Spin Relaxationszeit T2 der Blutprobe vom Methämoglobingehalt sowie dem Ausmaß stattgehabter Hämolyse beschrieben [18, 30, 46, 78, 97]. Von besonderer Bedeutung ist die diamagnetische bzw. paramagnetische Eigenschaft des Hämoglobineisens in Abhängigkeit vom Oxygenierungsgrad bzw. bei der Entstehung von Methämoglobin. Etwa 2/3 des Eisens im menschlichen Körper befindet sich als Hämoglobineisen im Erythron. Hämoglobin macht mehr als 90% des Trockengewichtes des Erythrozyten aus. Ein Molekül Hämoglobin besteht aus 4 Globinketten, von denen jede mit einem Häm-Molekül über zwei Histidinreste verbunden ist. Der Sauerstoff wird reversibel an das Fe2+-Ion des Häms (Ferroprotoporphyrin), chemisch Ferroprotoporphyrin IX, "gebunden". Die räumliche Anordnung der Globinketten bewirkt, daß Häm überwiegend von apolaren Gruppen umgeben ist und dadurch eine oxidierende Wirkung der O2-Bindung verhindert wird. Hämoglobin kann in Form von Oxyhämoglobin, Deoxyhämoglobin und Methämoglobin vorliegen. Das Verhältnis von Oxyhämoglobin zu Deoxyhämoglobin ergibt sich aus der Sauerstoffsättigung als Funktion des Sauerstoffpartialdruckes. Methämoglobin entsteht bei spontaner Oxidation von Hämoglobin. Der Eisenanteil des Hämoglobins beträgt 0,35% [89].

Ein neutrales Eisenatom hat 26 Elektronen, von denen 18 in geschlossenen Elektronenschalen vorliegen ($1s^22s^22p^63s^23p^6$). Bei Oxy- und Deoxyhämoglobin besetzen die übrigen 8 Elektronen die Orbitalkonfiguration $3d^64s^2$, d.h. das Eisen liegt in der Form Fe²⁺ vor. Die sechs 3d-Elektronen befinden sich in den Molekülorbitalen e_g (hochenergetisches Orbital) und t_{2g} (niederenergetisches Orbital). Wegen der starken Wechselwirkung des Liganden mit dem zentralen Eisenatom beim Oxyhämoglobin (e_g und t_{2g} Orbitale liegen weit auseinander) liegt in diesem Falle das Eisen in einer Low-Spin-Konfiguration vor (nur die t_{2g} Orbitale sind besetzt). Oxygeniertes Hämoglobin ist diamagnetisch, da sich der Elektronenspin des Fe²⁺ und der Elektronenspin des gebundenen Sauerstoffs aufheben [7, 12]. Diamagnetismus liegt dann vor, wenn alle Molekülschalen abgeschlossen sind, das negative χ führt dann zu einer Abschwächung des Magnetfeldes, während paramagnetische Substanzen (positives χ) das Magnetfeld verstärken.

Durch die verminderte Wechselwirkung des Liganden beim Deoxyhämoglobin (e_g - und t_{2g} - Orbitale nähern sich an) besetzen zwei 3d-Elektronen das höher gelegene e_g -Orbital. Es stehen 4 Elektronenspins parallel, wodurch das Molekül eine schwache paramagnetische Eigenschaft hat. Bei der Oxidation vom Hämoglobin zum Methämoglobin (geringe Energiedifferenz zwischen e_g - und t_{2g} -Orbitalen) ist die 3d Schale nur mit 5 Elektronen besetzt, d.h. das Eisen liegt in der Form Fe³⁺ vor. Diese Konfiguration ist eine sogenannte High-Spin-Konfiguration. Hierbei stehen alle Elektronenspins parallel, wodurch das Molekül eine starke paramagnetische Eigenschaft erhält.

Das Relaxationsverhalten von Blut bzw. Erythrozytenkonzentraten wird durch folgende Effekte beeinflußt:

- 1. durch paramagnetische Effekte (unterschiedliche Orbitalkonfigurationen des Eisens im Hämoglobin ergeben einen Unterschied in der magnetischen Suszeptibilität χ)
- 2. durch die Austauschdynamik des Hydratationswassers an der Erythrozytenoberfläche und der Proteinoberfläche, sowie der Diffusion zwischen intra- und extrazellulärem Wasser durch die Erythrozytenmembran.

1. Zum Paramagnetismus: Relaxationsphänomene bei quantitativen Kernspin-Resonanz-Untersuchungen werden bei Anwesenheit von Eisen durch die paramagnetische Relaxation mittels der Solomon-Bloembergen-Gleichungen beschrieben [67, 99]. Die Spin-Gitter- (1/T₁) und die Spin-Spin- Relaxationsrate (1/T₂), auch Längs- bzw. Querrelaxationsrate genannt, sind lineare Funktionen der Eisenkonzentration α_{Fe} (2).

$$\frac{1}{T_i} = \frac{1}{T_{i0}} + C_i \bullet \alpha_{Fe}$$
⁽²⁾

 $1/T_{i0}$ = nicht-paramagnetische Relaxationsrate

Der Geradenkoeffizient C_i (i= 1, 2) ist eine komplexe Funktion und kann in erster Näherung durch Gleichung (3) beschrieben werden.

$$C_i = C_0 \bullet \frac{\chi \bullet n}{r^6} \bullet f_i(\tau_c, \omega) \tag{3}$$

In dieser vereinfachten Form kommt die makroskopische magnetische Suszeptibilität χ anstelle der atomphysikalischen Parameter (Bohrsches Magneton, Spin-Quantenzahl) und der physikalischen Konstante C₀ sowie der funktionelle Ausdruck f_i (4, 5) für die Längs- und Querrelaxationsraten zur Anwendung [67, 99]. Die Korrelationszeit τ_c ist ein Parameter für das dynamische Verhalten des Protons, relativ zu den wechselwirkenden Atomen oder Molekülen.

$$f_1 = 6\tau_C \bullet \frac{1}{1 + (\omega \bullet \tau_C)^2} \tag{4}$$

$$f_2 = 3\tau_C \cdot (\frac{4}{3} + \frac{1}{1 + (\omega \cdot \tau_C)^2})$$
(5)

Die Gleichungen 2 bis 5 besagen, daß die Relaxationsraten proportional zu der Eisenkonzentration α_{Fe} , der magnetischen Suszeptibilität χ , der Anzahl n der Protonenliganden und umgekehrt proportional zu der sechsten Potenz des Abstandes zwischen Proton und Eisenatom sind. Die Zahl der Protonenliganden ist proportional zu r².

Wegen des schwachen Paramagnetismus χ des Deoxyhämoglobins ist bei der Umwandlung von Deoxyhämoglobin in Oxyhämoglobin nur eine schwache Erniedrigung der Relaxationsraten $1/T_1$ und $1/T_2$ zu erwarten.

Schon bei geringer Methämoglobinentstehung (starker Paramagnetismus χ) aus Oxyhämoglobin müßte eine deutliche Erhöhung der Relaxationsraten zu beobachten sein [19,36].

2. Zur Austauschdynamik des Hydratationswassers: Die o.g. Beschreibung der Relaxationsphänomene reicht für die Beschreibung der Wechselwirkungsmechanismen in viskosen makromolekularen Lösungen alleine nicht aus. Der wichtigste Effekt der Relaxationsverstärkung beruht hier auf dem Einfluß von Hydratationswasser auf die Beweglichkeit der Protonen in unmittelbarer Umgebung der makromolekularen Oberfläche. Daskiewicz et al. [33] zeigten als erste, daß die Relaxationseigenschaften von Geweben besser erklärt werden können, wenn man einen gewissen Anteil des Wassers als starre Schicht auf der Oberfläche der Makromoleküle annimmt. Wassermoleküle dieser Schicht stehen mit dem freien Wasser in heftigem Austausch. Typische Austauschzeiten sind 30-100 ns [18]. Dieses Zwei-Kompartmentmodell wurde als "twofraction-fast-exchange-model" bezeichnet und diente als Basis für die Erklärung der Spin-Gitter-Relaxation 1/ T₁ in Geweben. Die grundlegende Bedeutung des "fast-exchange" fand breite Akzeptanz, zwei Kompartimente alleine konnten die Relaxationseigenschaften makromolekularer Lösungen jedoch nicht befriedigend beschreiben. Grosch und Noak [51] zeigten, daß ein Dreikompartmentmodell nötig und ausreichend ist. Diese Modellvorstellung wurde durch eine Vielzahl weiterer Experimente bestätigt, unter anderem von Fullerton und Mitarbeitern [41-45]. Hiernach wird das Wasser der Hydratationsschicht ("hydration sheath") weiter unterteilt und besteht aus den Wassermolekülen, die in ihrer Beweglichkeit durch die Wechselwirkung mit Makromolekülen behindert sind. Hierzu zählen zum einen das direkt gebundene Wasser ("bound water") und zum anderen die Wassermoleküle, die keine direkten Bindungen zum Makromolekül eingehen, deren Bewegungen jedoch durch die Anwesenheit des Makromoleküls eingeschränkt sind ("structured water"). Die verbliebenen Wassermoleküle werden dem freien Wasser zugeordnet ("bulk water"). Hier sind die Wassermoleküle so weit von dem Makromolekül entfernt, daß die molekulare Beweglichkeit dem von reinem Wasser entspricht.

Angewandt auf Erythrozyten ist die Spin-Spin-Relaxationsrate $1/T_2$ dominiert durch Wechselwirkungen von Protonen mit dem Hämoglobin-Eisen in der Zelle.

Im Kontrast dazu ist die Spin-Gitter-Relaxationsrate $1/T_1$ im wesentlichen durch Austausch von Wasser der Hydratationsschicht an der Erythrozytenmembran und der Proteinoberfläche beeinflußt. In diesem Modell ist die Korrelationszeit τ_c ein Maß für die Beweglichkeit und somit auch ein Maß für die Austauschdynamik der Hydratationsschicht an der Erythrozytenmembran und an den Hämoglobinmolekülen. Da Schäden an der Zellmembran i. S. einer veränderten Zusammensetzung und Organisation der Membranlipide und –proteine [5] sowie eines Lipidverlustes [86,118,39,65,50,77,98,111] die entscheidenden strukturellen Veränderungen während der Lagerung von Erythrozyten sind und als Hauptursache für eine reduzierte Erythrozytenviabilität nach Lagerung [118] gelten, könnten Schäden an der Erythrozytenmembran z. B. als Folge der Lipidperoxidation [64, 71, 74, 75] sich hypothetisch auf die Korrelationszeit τ_c und somit auf $1/T_1$ auswirken.

Nach diesem Modell sollten sich Veränderungen an der Erythrozytenmembran auf $1/T_1$ und Veränderungen intrazellulärer Komponenten (z. B. Methämoglobinentstehung) auf $1/T_1$ und $1/T_2$ auswirken.

1.5 Problemstellung und Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Relaxationsverhaltens von Blutproben, deren Zusammensetzung und Konservierung den Bedingungen einer vorschriftsmäßigen Lagerung von Erythrozytenkonzentraten entsprechen.

- Dabei sollte insbesondere der Frage nachgegangen werden, ob die Kernspin-Resonanz frühzeitig und zerstörungsfrei Veränderungen an zellullären Blutkomponenten erfassen kann und damit als eine zusätzliche Methode in der Qualitätskontrolle von Erythrozytenkonzentraten dienen könnte.
- Dies sollte mit bekannten Qualitätsparametern verglichen werden. Die Malondialdehydbestimmung, als in der routinemäßigen Qualitätskontrolle (noch) nicht etablierter Beurteilungsparameter, dient zur Beurteilung einer möglichen Abhängigkeit des Relaxationsverhaltens der Blutproben von peroxidativen Prozessen der Erythrozyten.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit könnte sich die Möglichkeit ergeben, komplette, zu Transfusionszwecken kommerziell hergestellte Erythrozytenkonzentrate mit Hilfe der Kernspin-Resonanz auf ihren Qualitätszustand hin zu überprüfen.

2 Material und Methoden

2.1 Aufarbeitung der untersuchten Erythrozytenkonzentrate

Für die Untersuchungen wurden 30 Erythrozytenkonzentrate verschiedener freiwilliger Blutspender selektiert. Dies gelang ohne Verknappung des Versorgungsbetriebes, indem auf den Pool sogenannter "wissenschaftlicher Blutspender" zurückgegriffen werden konnte. In unserem Kollektiv besaßen diese Spender überwiegend durch vorangegangene Immunisierung erworbene irreguläre antierythrozytäre Antikörper ohne Krankheitswert.

Zur Herstellung eines Erythrozytenkonzentrates werden unter Beachtung der Vorschriften des Beutelsystem-Herstellers und nach den abteilungsinternen SOP (Standard Operating Procedures) 450 ml Vollblut des Spenders noch während des Entnahmevorganges in ein kommerzielles Beutelsystem in 63 ml CPD-Stabilisator (citrate-phosphate-dextrose) gegeben. Anschließend erfolgt die Separation in Erythrozytenkonzentrat und Plasma durch Zentrifugation im sterilen, geschlossenen Beutelsystem. Bei Einbringen der CPD-Vollblutkonserven mit den entsprechenden Satelliten- und Transferbeuteln (U-Quadruple-System, ehem. Fa. Biotrans) in die Zentrifuge wird der innere Zentrifugenbecher mit dem CPD-Blut enthaltenden Beutel und der äußere mit den drei Satelliten- / Transferbeuteln (S/T-Beutel) beschickt. Der Zentrifugationsvorgang erfolgt mit 3550 U/min, 4000 g entsprechend, bei einer Temperatur von 24 °C. Die Plateauzeit beträgt 11 Minuten, die Anlaufszeit 5 Minuten. Zur Trennung von Erythrozytensediment und Plasma wird die CPD-Blutkonserve erschütterungsfrei der Zentrifuge entnommen und in einen Separator eingesetzt. In einem halbautomatischen Vorgang wird der Blutbeutel durch eine Andruckplatte komprimiert und somit das im Überstand befindliche Plasma zur späteren Verwendung in den entsprechenden Satellitenbeutel überführt. Der Kompressionsvorgang wird beendet, sobald Anteile des Sedimentes einen optoelektronischen Schlauchdetektor passieren. Anschließend öffnet sich die Verbindungsklemme zu dem mit der additiven Lösung gefüllten Erythrozytenbeutel. In diesen Beutel werden die Erythrozyten durch eine erneute Kompression des Primärbeutels transferiert. Auch hier beendet ein optoelektronischer Detektor den Arbeitsschritt.

Das Erythrozytenkonzentrat (EK) liegt nach dem Separationsvorgang in 200 ml PAGGS-M suspendiert als sog. EK-S (EK in Suspension) im Satellitenbeutel vor. Das EK-S wird mit einem Handschweißgerät am Schlauch unmittelbar unterhalb des Primärbeutels steril abgeschweißt. Die Erythrozyten werden dann durch vorsichtiges manuelles Mischen weitgehend optimal suspendiert. Bis zur Laborfreigabe erfolgt eine kurzfristige Quarantänelagerung bei 4 °C. Die gesamte zulässige Lagerungszeit der EK-S beträgt bei 4 °C max. 49 Tage. Der im Primärbeutel verbliebene Buffycoat kann zur Herstellung von Thrombozytenkonzentraten weiterverwendet werden. Die vorliegenden Untersuchungen wurden an EK-S-Komponenten vorgenommen.

Vor Ausgabe zur Transfusion erfolgt die Konzentration der Erythrozytensuspension durch Zentrifugation und Verwerfen des überwiegenden Anteils der Additivlösung (135 ± 10 ml). Während der Lagerung entstandene Stoffwechsel- und Zerfallsprodukte werden somit weitgehend entfernt; ein Verfahren, das nach Einführung von B. v. Eisenhart-Rothe [108] als sogenanntes "Eppendorfer Modell" routinemäßig bei der Herstellung der Erythrozytenkonzentrate unter Verwendung von PAGGS-M zur Anwendung kam. Das zu Transfusionszwecken vorliegende Erythrozytenkonzentrat EK-1 PAGGS-M enthält schließlich die Erythrozytenmasse einer einzelnen Blutspende (Ausgangsvolumen 450 ± 45 ml) mit einem Hämatokrit zwischen 0,65 und 0,75 und einem Hämoglobin-Gesamtgehalt von durchschnittlich 54 g, wobei das einzelne Erythrozytenkonzentrat Schwankungen aufgrund der Spenderindividualität in engen zulässigen Grenzen unterliegt. Das Endvolumen beträgt 245 \pm 40 ml und setzt sich nach den Angaben in Tabelle 1 zusammen.

Erythrozyten	170 <u>+</u> 30 ml	(Gesamtvolumen der Erythrozyten)
Leukozyten	max. 1,2 x 10 ⁹	(verfahrensbed. Restkontamination)
Thrombozyten	max. 0,1 x 10 ¹¹	(verfahrensbed. Restkontamination)
Plasma	4-12 ml	(Plasma-Reste)
CPD-Stabilisator	< 3 ml	(Stabilisator-Reste)
PAGGS-M-Additivlösung	65 <u>+</u> 10 ml	(Restvolumen der Additivlösung)

Tab. 1: Zusammensetzung des Erythrozytenkonzentrates EK-1 PAGGS-M.

Die Kernspin-Resonanz-Untersuchungen fanden einen Tag nach der Blutspende Herstellung der Erythrozytenkonzentrate bzw. nach Bereitstellung von Erythrozytenkonzentraten aus dem Bestand der Blutbank statt. Die folgenden Messungen wurden in einwöchigen Abständen durchgeführt. Dazu wurden die Erythrozyten des EK-S durch manuelles Wenden des Blutbeutels suspendiert und 20 ml dieser Suspension in sterile Einmalgefäße aus Kunstoff (Volumen 30 ml) gegeben. Die Probenentnahme fand über den im Blutbeutelsystem integrierten Verbindungsschlauch zum Satellitenbeutel statt. Nach Entnahme der Probe wurde der Schlauch vor der Entnahmestelle verschweißt und das EK-S zur weiteren Lagerung wieder in die Kühlkammer gebracht. Die Proben wurden nach Erlangen der Raumtemperatur, d.h. nach etwa einer Stunde für 10 min bei 2000 U/min (670 g entsprechend) zentrifugiert, um eine reproduzierbare Packungsdichte der Erythrozyten zu gewährleisten. - 15 -

2.2 Kernspin-Resonanz-Untersuchung (KSR)

Die Kernspin-Resonanz-Untersuchungen erfolgten im Sediment der Proben. Dazu wurden die Meßgefäße in konstanter Geometrie angeordnet und mit Hilfe des mobilen Patientenschlittens in das Zentrum des Tomographens gebracht. In einem ersten Schritt erfolgte ein sog. Planungsscan in transversaler Schnittführung, also in Längsrichtung der Meßgefäße. Durch die bildgebende Datenverarbeitung kamen die Proben visuell zur Darstellung, was bei jeder einzelnen Probe die sichere Unterscheidung zwischen dem zu untersuchenden Sediment und dem Überstand ermöglichte. Anhand dieses Planungsscans ließ sich die eigentliche Meßschicht exakt durch das Sediment sämtlicher Proben legen. Die Dicke dieser Meßschicht betrug 13 mm.

Die Untersuchungen wurden an einem Kernspin-Resonanz-Tomographen mit einer Feldstärke $B_0 = 1.5$ Tesla und einer Lamorfrequenz f= 63,87 MHz (Gyroscan S 15 der Fa. Philips) durchgeführt. Um die Relaxationszeiten T_1 und T_2 der Proben zu bestimmen, kam die sogenannte Mixed-Sequence als Meßalgorhythmus zur Anwendung. Die Mixed-Sequence ist eine Kombination aus der sogenannten Inversion-Recovery (IR) Sequenz und einer Spin-Echo (SE) Sequenz. Die am Tomographen verwendeten Kalkulationsprogramme zur Berechnung von T_1 und T_2 aus der Mixed-Sequence beruhen auf der sogenannten RLSQ-Methode [70]. Zum Verständnis dieser komplizierten Sequenz werden die beiden Einzelsequenzen zusammen mit den Grundlagen der Kernspin-Resonanz im Anhang, Abschnitt 7.1, kurz erläutert. Der nahezu zeitsynchrone Ablauf der IR- und SE-Sequenz (Sequenzen um Repetitionszeit T_R versetzt) in der Mixed-Sequence erhöht bei gleicher Meßzeit die Genauigkeit der Bestimmung von T_1 und T_2 , da diese Parameter aus einem gemeinsamen Datensatz berechnet werden. Artefakte, die bei Einsatz getrennter Meßsequenzen auftreten könnten, wie z. B. Temperaturschwankungen zwischen singulären Messungen, werden zusätzlich eliminiert.

Für die Repetitionszeit T_R^{IR} der Inversion-Recovery-Teilsequenz wählten wir in etwa das zweifache der zu messenden T_1 -Zeit, so daß nach dieser Zeit die Magnetisierung für alle Proben wieder zu 80-95% relaxieren konnte (gewählt: $T_R^{IR} = 2020$ ms). Die Software des Tomographen verlangte, daß die Repititionszeit T_R^{SE} der Spin-Echo-Teilsequenz kürzer als die T_R^{IR} ist (gewählt: $T_R^{SE} = 2000$ ms). Es wurden 5 Echos bei einer Spin-Echozeit $T_E = 35$ ms gewählt, d.h. im Intervall von 35-175 ms nach Anregung wurden die Resonanzintensitäten gemessen. Damit war gewährleistet, daß die T_2 - Relaxationszeiten (110-150 ms) sicher berechnet wurden. Als Meßmatrix wurde eine 128 x 128-Matrix aufgenommen, d.h., das Meßfeld von 200 mm x 200 mm über alle gemessenen Proben wurde bei einer Schichtdicke von 13 mm in einer Voxelgröße von 1,6 mm x 1,6 mm x 13 mm aufgelöst. Die Parameter der Mixed-Sequence sind zusammenfassend in Tabelle 2 dargestellt. Die aus der zweidimensionalen Rekonstruktion berechneten T_1 - und T_2 - Daten wurden cursorgesteuert in einem Meßfeld von jeweils 12 mm Durchmesser aus dem jeweiligen Bild der Proben entnommen. Die so ermittelten Relaxationsparameter T_1 und T_2 stammen somit aus einem Quellvolumen von ca. 1,5 cm³, 45 Voxel entsprechend. Aus den einzelnen Voxelergebnissen ergebenen sich die Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Meßzeit betrug 17 Minuten.

Da eine unterschiedliche *Packungsdichte* der zellulären Probenphase, verursacht durch mögliche Schwankungen im Zentrifugationsprozeß, maßgeblich an Veränderungen der Relaxationszeiten beteiligt sein könnte, wurden zur Abschätzung dieser Einflußgröße Proben zweier Erythrozyten-konzentrate bei sonst gleicher Präparation bei 2000 U/min (\cong 670 g), bei 1500 U/min (\cong 380 g) und 2500 U/min (\cong 1050 g) zentrifugiert. Die Messungen erfolgten wie üblich im Sediment der Proben.

T_{R}^{IR}	2020 ms	
T_R^{SE}	2000 ms	
T _I	400 ms	
$T_{\rm E}$	5 x 35 ms	
Matrix	128 x 128	
Schichtdicke	13 mm	
Wiederholung der Meßsequenz	2 x	

Tab. 2: Parameter der Mixed-Sequence, Gyroscan S 15 (magnetische Flußdichte: 1.5 T).

Um den Einfluß von *Schockgefrieren* auf die Relaxationsraten $1/T_1$ und $1/T_2$ qualitativ abzuschätzen, wurden Proben aus zwei vorschriftsmäßig gelagerten Erythrozytenkonzentraten unterschiedlichen Alters entnommen und durch Schockgefrieren (Gabe des Probenbehälters in flüssigen Stickstoff) anteilig hämolysiert. Die Bestimmung von T_1 und T_2 erfolgte auch hier im Sediment der Proben, in diesem Falle aus einer Mischung aus hämolysierten und intakten Erythrozyten und denaturiertem Hämoglobin.

Oxidativer Stress erfolgte durch Zugabe von Wasserstoffperoxyd. Dabei wurden 2 Erythrozytenkonzentrate (EK-S) direkt nach Produktion in jeweils 3 Satellitenbeutel gleichen Endvolumens aufgeteilt. Analog dem Herstellungsvorgang wurden die Satellitenbeutel erneut zentrifugiert. Sediment und Additivlösung wurden durch eine mechanische Klemme voneinander getrennt. Anschließend erfolgte in jeweils 2 der 3 Satellitenbeutel die Injektion des Wasserstoffperoxyds in die Additivlösung über ein an den Satellitenbeutel angesetztes Schlauchstück. Die gleichmäßige Verteilung des Wasserstoffperoxyds in der Additiv-lösung wurde durch manuelles Wenden erreicht. Die Resuspension der Erythrozyten erfolgte durch Öffnen der Verschlußklemme. Die erreichte Endkonzentration an Wasserstoffperoxyd betrug im EK-S, d.h. im Gesamtvolumen von Erythrozyten und additiver Lösung, 20 bzw. 40 mM.

- 17 -

2.3 Malondialdehydbestimmung (MDA)

Die Bestimmung der Malondialdehydkonzentration erfolgte in der Additivlösung zehn verschiedener Erythrozytenkonzentrate. Parallel zur KSR-Untersuchung wurden einen Tag, drei und sieben Tage nach Herstellung der EK-S sowie nachfolgend in einwöchigen Abständen ca. 10 ml der Erythrozytensuspension in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 4 °C und 3500 U/min für 10 min zentrifugiert. Etwa 1,5 ml des Überstandes wurde in ein Kryoröhrchen gegeben und bis zum Zeitpunkt der MDA-Bestimmung bei –70 °C gelagert. Der gesamte Beobachtungszeitraum betrug 42 Tage.

Die MDA-Bestimmung erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen LPO-586 kit (Fa. Bioxytech, Bonneuil Sur Marne, Frankreich). Der LPO-586-Assay ist laut Angaben des Herstellers weniger störanfällig als der TBA-Assay und derzeit als am ehesten geeignet, biochemisch Lipidperoxidation nachzuweisen und wurde deswegen, und aus Gründen der einfachen Handhabung eines komerziellen Testansatzes für unsere Untersuchungen verwandt.

Malondialdehyd reagiert demnach bei 60 °C mit dem chromogenen Reagenz R1 des Testansatzes. Dabei reagiert ein Molekül MDA mit zwei Molekülen R1. Durch Zugabe von 37% iger Salzsäure wird der Nachweis spezifisch für MDA, da die 4-Hydroxyalkenale unter diesen Bedingungen nur schwach reaktiv sind. Das stabile, pinkfarbene Endprodukt hat seine maximale Absorption bei einer Wellenlänge von 586 nm.

Folgene Reagenzien fanden dabei Verwendung:

- 1. chromogenes Reagenz (11,4 mM, in Acetonitrile)
- 2. Methanol, 100%ig
- 3. HCl, 37%ig
- 4. MDA-Standard (10 mM 1,1,3,3-Tetramethoxypropane)

Zur Erstellung der Kalibrationskurve wurde der gelieferte MDA-Standard durch Zugabe der Additivlösung PAGGS-M auf eine Konzentration von 100, 50, 25, 12,5, 10, 6,25, 5, 3,125 und $2,5 \,\mu$ M verdünnt. An den Untersuchungstagen wurde jeweils eine Verdünnungsreihe des MDA-Standards mitgeführt.

Die Vorbereitung des Reagenz R1 erfolgte nach Herstellerangaben durch Zugabe von reinem Methanol. Jeweils 650 μ l dieses verdünnten R1 wurden in die Reagenzgläser pipettiert und anschließend mit 200 μ l der Probe (Additivlösung bzw. Standard) beschickt. Nach Zugabe von 200 μ l HCl und gründlicher Durchmischung erfolgte die 60minütige Inkubation im Wasserbad bei 60 °C. Nach der Abkühlung in Eis wurde das Probenröhrchen bei 3500 U/min ((1040 g) 10 min. zentrifugiert um eventuell vorhandene zelluläre Bestandteile abzusetzen. Das pinkfarbe-

ne Reaktionsprodukt wurde in die Eimalküvette gegeben und bei 586 nm im Spektrophotometer gemessen. Den Leerwert bildete eine Probe reiner Additivlösung nach gleicher Reaktionsabfolge.

2.4 Bestimmung hämatologischer Parameter

Die hämatologischen Parameter mittleres korpuskuläre Volumen (Mean Corpuscular Volume, MCV), Hämatokrit (Hkt), Hämoglobin (Hb), mittlere korpusculäre Hämoglobinkonzentration (Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration, MCHC) wurden bestimmt, um Konzentrationsänderungen des Hämoglobins zu erfassen, das wegen seiner paramagnetischen Eigenschaften entscheidend am Relaxationsprozeß beteiligt ist. Hierzu wurden 5 ml des Erythrozytenkonzentrates in ein EDTA-Röhrchen gegeben. Die Bestimmung erfolgte durch Einsatz eines maschinellen Zellzählers (Coulter, S-Plus STKR). An einem Kollektiv von zehn in PAGGS-M gelagerten Erythrozytenkonzentraten erfolgte die Bestimmungen des pH-Wertes bei Raumtemperatur unter Verwendung einer pH-Elektrode.

2.5 Statistische Methoden

Eine lineare Regressionsanalyse wurde auf die von der Lagerungszeit abhängigen Parameter wie $1/T_1$, $1/T_2$, MDA, MCV, MCHC und pH angewandt, um deren Zeitabhängigkeit auf Signifikanz zu prüfen. Dabei wurde der Regressionskoeffizient m und dessen Standardabweichung Δm mit Hilfe der Regressionsfunktion (engl. LINEST) der Tabellenkalkulations-Software EXCEL (Version 2000, Microsoft, Seattle, USA) bestimmt. Der Quotient m/ Δm stellt die T-Variable des T-Tests dar, der zur zweiseitigen Signifikanzprüfung herangezogen wurde (TDIST-Funktion). Der stochastische Zusammenhang zwischen den anähernd normalverteilten Parametern MDA und $1/T_1$ (Schiefe < 0,5, Kurtosis < 0,5) wurde mit dem Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten aud Signifikanz geprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Kernspin-Resonanz-Untersuchungen

3.1.1 Untersuchung an regulär gelagerten Erythrozytenkonzentraten

Die Ermittlungen der Relaxationsraten $1/T_1$ und $1/T_2$ der Kernspin-Resonanz-Untersuchung erfolgte im Sediment einzelner Proben von insgesamt 30 Erythrozytenkonzentraten. Um die Entwicklung der Meßergebnisse auch über die maximal zulässige Lagerungszeit von 49 Tagen hinweg zu erfassen, wurden auch Erythrozytenkonzentrate mit bereits fortgeschrittener Lagerungszeit in die Studie aufgenommen. Die maximale Lagerungszeit betrug 105 Tage. Zur Übersicht wurde in Abb. 2 die Anzahl der Proben der entsprechenden Lagerungszeit zugeordnet. Die einzelnen Meßergebnisse sämtlicher Proben befinden sich im Anhang (7.4). Die Abhängigkeit der Längsrelaxationsrate von der Lagerungszeit ist in der Abb. 3 zusammenfassend dargestellt.



Anzahl Proben

Abb. 2: Anzahl der untersuchten Proben in Zuordnung zur Lagerungszeit in Wochen (1. Woche entspricht 1-7 Tage etc.).



Abb. 3: Längsrelaxationsraten $1/T_1$ [s⁻¹] sämtlicher Proben in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage] mit Darstellung der linearen Regression und des 95% Konfidenzintervalls

Die Längsrelaxationsrate (Spin-Gitter-Relaxation) der Proben der ersten Lagerungswoche betrug $0,93 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$ und stieg während der weiteren Lagerung linear an. Bei den Proben der 7. Lagerungswoche bestimmten wir ein $1/T_1$ von $1,09 \pm 0,06 \text{ s}^{-1}$. Proben der 15. Lagerungswoche, also am Ende des Untersuchungszeitraumes, zeigten eine Längsrelaxationsrate von $1,49 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$. Die von der Lagerungszeit tabhängige Änderung der Längsrelaxationsrate ist mit Hilfe einer linearen Regression analysiert worden: $1/T_1(t) = (0,0055\pm0,0002) \cdot t + (0,885\pm0,007)$. Der relative Fehler des Regressionskoeffizienten von nur 4% zeigt bereits die Signifikanz der Zeitabhängigkeit an (T-Wert = 33,6; p (T-test) < 10⁻⁹⁰).

Die Querrelaxationsraten (Spin-Spin-Relaxation) $1/T_2$ betrug bei den maximal eine Woche alten Proben 7,56 \pm 0,70 s⁻¹ und zeigte während der gesamten Lagerungzeit keine signifikante Änderung. In Abb. 4 ist die Abhängigkeit der Querrelaxationsrate von der Lagerungszeit wiedergegeben. Für die Querrelaxationsrate ergibt sich mit Hilfe der linearen Regression: $1/T_2(t) =$ $(0,0009\pm0,0015)\cdot t + (7,33\pm0,06)$. Damit ist der Regressionskoeffizient nicht von Null zu unterscheiden (p (T-test) > 0,5).



Abb. 4: Querrelaxationsrate $1/T_2$ [s⁻¹] sämtlicher Proben in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage]

3.1.2 Einfluß von Präparationsänderungen auf die KSR-Ergebnisse

Packungsdichte: Eine veränderte Packungsdichte der Erythrozyten durch Variationen der Zentrifugation in der Vorbereitungsphase könnte sich auf die KSR-Relaxation auswirken. Drei Proben eines Erythrozytenkonzentrates (Alter 21 Tage) wurden bei 1500 U/min, bei 2500 U/min und bei den üblichen 2000U/min zentrifugiert. Selbst bei diesen unrealistisch hohen Schwankungen der Umdrehungszahl liegen die Werte für $1/T_1$ und $1/T_2$ innerhalb der Streubreite (Tab. 3).

Tab. 3: Einfluß der Zentrifugation auf $1/T_1$ und $1/T_2$ [s⁻¹] bei Proben eines 21 Tage alten Erythrozytenkonzentrates, die bei 1500 U/min, 2000 U/min und 2500 U/min zentrifugiert wurden. gelagert wurden. Die Standardabweichungen ergeben sich aus den Einzelmessungen der KSR-Untersuchung.

Zentrifugation	$1/T_1 [s^{-1}]$	SD	$1/T_2 [s^{-1}]$	SD
1500 U/min.	1,07	0,02	6,85	0,23
2000 U/min.	1,06	0,01	7,19	0,21
2500 U/min.	1,07	0,01	7,41	0,16

Schockgefrieren : Eine Hämolyse von Erythrozyten würde das Relaxationsverhalten maßgeblich beeinflussen (s. Kap. 4.3). Deswegen wurden $1/T_1$ und $1/T_2$ an zwei durch Schockgefrierung teilhämolysierten Proben gemessen. Die Meßvolumina bestanden in diesem Falle aus einer Mischung aus hämolysierten und intakten Erythrozyten und denaturiertem Hämoglobin. Die Vollständigkeit der Hämolyse wurde nicht geprüft, da nur die Tendenz der Auswirkungen einer Hämolyse auf die Relaxationszeiten abgeschätzt werden sollte. Außerdem muß offen bleiben, in wie weit das denaturierte Hämoglobin im Meßvolumen die Ergebnisse beinflußt



Abb. 5: Arithmetische Mittelwerte \pm SD von $1/T_1$ [s⁻¹] vor und nach Hämolyse von Proben zweier Erythrozytenkonzentrate, die 8 bzw. 46 Tage gelagert wurden. Die Standardabweichungen ergeben sich aus den Einzelmessungen der KSR-Untersuchung.



Abb. 6: Arithmetische Mittelwerte \pm SD von $1/T_2$ [s⁻¹] vor und nach Hämolyse von Proben zweier Erythrozytenkonzentrate, die 8 bzw. 46 Tage gelagert wurden. Die Standardabweichungen ergeben sich aus den Einzelmessungen der KSR-Untersuchung.

Die Mischung aus hämolysierten und intakten Erythrozyten hat bei sonst gleichen Untersuchungsbedingungen einen Anstieg von $1/T_1$ um ca. 40% sowie einen Abfall von $1/T_2$ auf 2/3 des Ausgangswertes zur Folge (Abb. 5 und 6).

3.1.3 Provokation oxidativer Prozesse durch Wasserstoffperoxid

Oxidative Prozesse an Erythrozyten können durch Wasserstoffperoxid initiiert werden [101]. Die Auswirkungen der Zugabe von H_2O_2 auf die Relaxationsraten $1/T_1$ und $1/T_2$ sind in den Abb. 7 und 8 wiedergegeben. Die Konzentration von H_2O_2 in den Lagerungsbeuteln (zelluläre Phase und Additivlösung) betrug nach Zugabe 20 mmol/l bzw. 40 mmol/l. Die Präparationen mit Zusatz von H_2O_2 und die Kontrolle entstammen demselben Erythrozytenkonzentrat (Kap. 2.2). Die Kernspin-Resonanz-Untersuchung wurde erstmals einen Tag nach Aufbereitung durchgeführt. Erneute Messungen erfolgten nach 7tägiger und 28tägiger Lagerung. Die Längsrelaxationsrate $1/T_1$ erhöhte sich innerhalb eines Tages nach Zugabe des Wasserstoffperoxydes auf das 1,09-fache des Wertes der Kontrollprobe bei einer Konzentration von 20 mmol/l und auf das 1,19-fache bei 40 mmol/l (Abb. 7). Ein signifikanter Unterschied war auch noch nach 7 Tagen meßbar ($\Delta T_1 > 2$ SD). Bei weiterer Lagerung näherten sich die Werte von $1/T_1$ dem der Kontrollprobe an und es bestand nach 28tägiger Lagerung keine signifikante Differenz mehr. Die Querrelaxationsrate $1/T_2$ zeigte bei den Meßzeitpunkten 1 und 7 Tagen keinen signifikanten Unterschied für alle Präparationen. Nur bei der Präparation mit 40 mmol/l H₂O₂ war eine signifikante Veränderung am 3. Meßtag (28 Tage Lagerungszeit) eingetreten (Abb. 8).



Abb. 7: Arithmetische Mittelwerte \pm SD der $1/T_1$ -Bestimmung von jeweils 3 Proben zweier Erythrozytenkonzentrate zu verschiedenen Lagerungszeitpunkten nach Zugabe von Wasserstoffperoxyd in 2 verschiedenen Konzentrationen. Die Zugabe des H₂O₂ erfolgte am Tag 1 der Lagerung.



Abb. 8: Arithmetische Mittelwerte \pm SD der $1/T_2$ -Bestimmung von jeweils 3 Proben zweier Erythrozytenkonzentrate zu verschiedenen Lagerungszeitpunkten nach Zugabe von Wasserstoffperoxyd in 2 verschiedenen Konzentrationen. Die Zugabe des H₂O₂ erfolgte am Tag 1 der Lagerung.

3.2 Malondialdehydkonzentration in der Additivlösung PAGGS-M

Da Malondialdehyd ein stabiles Endprodukt der Lipidperoxidation ist, wurde die Bestimmung dieser Konzentration als indirekte Nachweismethode der oxidativer Prozesse gewählt, wie auch bei bisherigen Untersuchungen zur Lipidperoxidation an gelagerten Erythrozyten [71, 74, 75]. Die Messung erfolgte im Überstand der Erythrozyten, einem Gemisch aus Restplasma, CPD-Stabilisator und additiver Lösung PAGGS-M sowie Stoffwechselprodukten und Metaboliten (s. Tab. 1) von zehn verschiedenen Erythrozytenkonzentraten (Kap. 2.3).

Zusammenfassend ist der Anstieg der MDA-Konzentration über die Lagerungszeit (1-42 Tage) in Abb. 9 dargestellt. Die mittlere MDA-Konzentration betrug zu Beginn der Lagerung 1,64 μ m/l und stieg auf eine Konzentration von 7,94 μ m/l nach 42 Tagen Lagerungszeit an. Die von der Lagerungszeit t abhängige Änderung der MDA-Konzentration ist mit Hilfe einer linearen Regression analysiert worden: MDA(t) = (0,150±0,010)·t + (1.714±0,235). Der relative Fehler des Regressionskoeffizienten von nur 6,7% zeigt bereits die Signifikanz der Zeitabhängigkeit an (T-Wert = 15,1; p (T-test) = 5,4x10⁻⁶). Die Meßergebnisse der einzelnen Proben befinden sich im Anhang (7.3).



Abb. 9: Arithmetische Mittelwerte \pm SD der Malondialdehydkonzentation [μ mol/l] in der Additivlösung PAGGS-M der untersuchten Proben während der Lagerungszeit [Tage].

3.3 Hämatologische Parameter

Da das Hämoglobineisen eine wichtige Determinante für das KSR-Relaxationsverhalten der Proben ist, war es notwendig, den erythrozytären Hämoglobingehalt zu bestimmen.

Aus den idividuellen Hämoglobinkonzentrationen $(14,1 \pm 1,0 \text{ g/dl})$ von 15 Erythrozytenkonzentraten und den entsprechenden Hämatokritwerten $(0,43 \pm 0,03)$ wurde die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) über die gesamte Lagerungszeit errechnet (Abb. 10). Die MCHC betrug während des Untersuchungszeitraumes von 15 Wochen im Mittel 32,5 \pm 0,89 g/dl.



Abb. 10: MCHC [g/dl] der Erythrozyten von 15 Erythrozytenkonzentraten während der Lagerungszeit [Tage].

Weitere wichtige Einflußgrößen für die Interpretation und Diskussion der Ergebnisse sind das mittlere korpuskuläre Erythrozytenvolumen (MCV) und der pH-Wert.

Das MCV war über die ersten zehn Lagerungswochen im Rahmen der Fehlerbreite konstant und stieg erst ab ca. 70 Lagerungstagen bei zusätzlich größerer Streuung an (Abb. 11).

Veränderungen des pH-Wertes der Proben sind wichtig für das Verständnis der Relaxationsraten, da eine Erniedrigung des pH-Wertes die Sauerstoffbindungskurve nach rechts verschiebt und zusätzlich das Relaxationsverhalten über Änderungen der Hydratationsschicht der Erythrozyten beeinflußt. Die Bestimmungen wurden an einem separaten Kollektiv von 10 Erythrozytenkonzentraten vorgenommen. Die Messungen erfolgten in der Additivlösung PAGGS-M. Eine Darstellung der Veränderung des pH-Wertes über die ersten 56 Tage ist in Abb. 12 wiedergegeben. Der pH-Wert sinkt stetig von 7,17 (Tag 1) auf 6,49 (Tag 56). Die von der Lagerungszeit t abhängige Änderung pH-Wertes ist mit Hilfe einer linearen Regression analysiert worden: $pH(t) = (-0.0121\pm0.0012) \cdot t + (7.08\pm0.04)$. Der relative Fehler des Regressionskoeffizienten von nur 10% zeigt bereits die Signifikanz der Zeitabhängigkeit an (T-Wert = 10,4; p (T-test) = 1,6x10⁻⁵). Durch die ATP-abhängigen Protonenpumpen des Erythrozyten ist davon auszugehen, daß die intrazelluläre Abnahme des pH-Wertes wenn überhaupt, dann wesentlich geringer ausfällt.



Abb. 11: MCV [fl] der Erythrozyten von 15 Erythrozytenkonzentraten in Abhängigkeit von der Lagerungszeit t [Tage].



Abb. 12: pH-Wert <u>+</u>SD in der additiven Lösung PAGGS-M von 10 Erythrozyten-konzentraten in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

4 Diskussion

4.1 Kernspin-Resonanz-Untersuchungen im Vergleich zu den Malondialdehydbestimmungen

Die Ergebnisse der KSR-Untersuchungen zeigen einen linearen Anstieg der Längsrelaxationsrate $1/T_1$ mit Zunahme der Lagerungszeit. Die Querrelaxationsrate $1/T_2$ zeigt keine signifikante Änderung im zeitlichen Verlauf.

Sullivan et al zeigten in ihren KSR-Untersuchungen, daß die Oberflächenladung und der Anteil polarer Gruppen in der Zellmembran die Struktur des Hydradationswassers bestimmen und erklärten eine Zunahme der Relaxationsraten durch Interaktion intra- und extrazellulären Wassers mit der Zellmembran, dem Zytoskelett und dem Hämoglobin des Erythrozyten und durch Veränderungen des Anionen/Kationen-Transports durch die Erythrozytenmembran [104].

Änderungen des Oxydationszustandes oder des Oxygenierungsgrades des Hämoglobins können nicht ursächlich für die Zunahme der Längsrelaxationsrate sein, da dann insbesondere auch die Querrelaxationsrate zunehmen würde (s. 4.2).

Bisherige Untersuchungen belegen, daß oxidative Prozesse zu einem erheblichen Anteil zum Qualitätsverlust gelagerter Erythrozyten beitragen [71, 74, 75]. An einem Teilkollektiv von zehn Erythrozytenkonzentraten bestimmten wir in Abhängigkeit der Lagerungszeit die MDA-Konzentration als ein stabiles Endprodukt der LPO in der additiven Lösung. Die Ergebnisse belegen die Schädigung der Erythrozyten durch Lipidperoxidation durch den Anstieg der Malondialdehydkonzentration in der Additivlösung von 1,64 ± 1,74 μ mol/l zu Beginn der Lagerung auf 7,94 ± 1,93 μ mol/l nach 42tägiger Lagerung (Abb. 9). Zu vergleichbaren Ergebnissen kam die Arbeitsgruppe von Knight und Mitarbeiter [74], die den MDA-Gehalt mehrerer Additivlösungen während 18tägiger Lagerung quantifizierten. Danach stieg die MDA-Konzentration in CPDA-1 (Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin) von 1,16 μ m/l zu Beginn der Lagerung auf 6,45 μ m/l am 18. Lagerungstag an. Um eine Abhängigkeit zwischen den Ergebnissen der KSR-Untersuchungen und oxidativer Prozesse zu prüfen, wurden die gemessenen Längsrelaxa-tionsraten den entsprechenden MDA-Konzentrationen gegenübergestellt (Abb. 13).

Unsere KSR-Ergebnisse an dieser Teilgruppe ergaben eine Längsrelaxationsrate von durchschnittlich 0.91 ± 0.03 s⁻¹ (1 Tag Lagerung), nach 42 Tagen Lagerung 1.13 ± 0.04 s⁻¹ und nach 77 Tagen Lagerung 1.24 ± 0.04 s⁻¹. Die Querrelaxationsraten $1/T_2$ zeigen in dieser Teilgruppe, wie auch in dem Gesamtkollektiv, keine signifikanten Änderungen während der gesamten Lagerungszeit.

Die lineare Korrelation der Relaxationsrate $1/T_1$ mit der Malondialdehydkonzentration ist hoch signifikant (p< 10^{-3}).



Abb. 13: Korrelation zwischen der KSR-Spin-Gitter Relaxationsrate $1/T_1$ [s⁻¹] und der Malondialdehydkonzentration [μ mol/l] bei 70 Proben von 10 Erythrozytenkonzentraten (R= 0,71; p< 0,001).

Wie in Kap. 1.4 erläutert, beschreibt das Fast-Exchange-Model das Relaxationsverhalten von Protonen an makromolekularen Oberflächen, wonach die Interaktion des Protons mit dem Makromolekül einen Verlust der Resonanz bedeutet. Hiernach läßt sich die Kontaktfläche zwischen Makromolekül und wässrigem Medium in drei Schichten unterteilen: dem Anteil der Membranund Proteinhydratationsschicht von direkt am Makromolekül durch Wasserstoffbrückenbindungen gebundenem Wasser ("structured water"), dem locker gebundenem Wasser der Membranhydratationsschicht ("bound water") und dem freien Wasser ("bulk water") [42, 43]. Nach dieser Modellvorstellung wird die Längsrelaxationszeit T₁ im wesentlichen durch Wechselwirkungen zwischen den Makromolekülen und dem gebundenen Wasser bestimmt. Da die beobachtete Änderung der Längsrelaxationsrate nicht durch Ladungsänderungen des Hämoglobins erklärt werden können (s. 4.2 und 4.3), konzentriert sich das Interesse auf Veränderungen der Zellmembran und deren Wechselwirkungen mit dem Wasser der Umgebung. Auf welchen Wegen die untersuchten oxidativen Veränderungen mit den polaren Eigenschaften der Zellmembran wechselwirken, muß dabei offen bleiben. Postuliert man eine Zunahme der Polarität der Zelloberfläche, so ist ein verringerter Abstand der Protonen des Wassers zu den Makromolekülen der Erythrozytenoberfläche die Folge. Diese räumliche Annäherung bedeutet eine intensive magnetische Wechselwirkung des Protons mit dem Makromolekül [120] (die Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen Wasser und Makromolekül ist proportional zu 1/r⁶, s. Solomon-Bloembergen-Gleichungen (2)). Karplus und Rossky [69] berechneten den mittleren Abstand der gebundenen Wassermoleküle von dem polaren Anteil eines Polypeptids auf 2,9 Å, während Wassermoleküle zu apolaren Oberflächen einen Abstand von 3,7 Å einnehmen. Eine Zunahme der Membranpolarität würde nach dem Fast-Exchange-Model eine Zunahme der Längsrelaxationsrate hervorrufen.

Die geführte Diskussion liefert keinen direkten Zusammenhang zwischen oxidativen Prozessen und den Ergebnissen der KSR-Untersuchungen. Aus diesem Grunde erfolgte die Provokation oxidativer Prozesse durch Zugabe von Wasserstoffperoxyd. Dieses führt u.a. direkt zu einer Schädigung der Membranschicht im Sinne induzierter Lipidperoxidation [101]. Unsere KSR-Ergebnisse zeigen eine Zunahme von $1/T_1$.

Neben der Lipidperoxidation muß auch mit oxidativen Veränderungen an den aromatischen und heterozyklischen Aminosäuren des Hämoglobins gerechnet werden, das dadurch teilweise denaturiert wird und seine polaren Eigenschaften ändert. Dieser Aspekt, der experimentell nicht weiter verfolgt wurde, ist wichtig, da nach grober Abschätzung nur ca. 1% des Hydratationswassers an den inneren und äußeren Grenzflächen der Plasmamembranen und zu 99% an der Oberfläche von Hämoglobinmolekülen "gebunden" ist.

Neben oxidativen Vorgängen könnten weitere Prozesse unsere Ergebnisse beeinflussen. Hierzu werden nachfolgend einige Überlegungen diskutiert.

4.2 Paramagnetische Einflüsse des Hämoglobins

Bei der Interpretation der Ergebnisse der KSR-Untersuchungen müssen, wie in Kap. 1.4 beschrieben, die magnetischen Einflüsse verschiedener Hämoglobinderivate berücksichtigt werden. Die durch Solomon und Bloembergen beschriebenen Relaxationsphänomene wirken sich auf T_1 und auf T_2 aus und sind abhängig von der magnetischen Suszeptibilität der eisenhaltigen Moleküle. Hierbei muß die unterschiedliche Wechselwirkung der Protonen mit folgenden drei Derivaten des Hämoglobins berücksichtigt werden:

- 1. oxygeniertes Hämoglobin
- 2. deoxygeniertes Hämoglobin
- 3. oxidiertes Hämoglobin (Methämoglobin)

zu 1: Oxygeniertes Hämoglobin ist diamagnetisch, da sich der Elektronenspin des Fe²⁺ und der Elektronenspin des gebundenen Sauerstoffs aufheben [13, 16]. Oxygeniertes Hämoglobin hat somit keinen Einfluß im Sinne paramagnetischer Relaxationsverstärkung.

zu 2: Deoxygeniertes Hämoglobin besitzt eine nur schwach paramagnetische Eigenschaft [13,19] (s. Kap. 1.4). Die ungepaarten Elektronen des deoxygenierten Hämoglobin-Eisens sind vom umgebenden Wasser durch Aminosäuren in den sog. "Hämtaschen" des Hämoglobinmoleküls geschützt, so daß sich Wassermoleküle dem Hämoglobineisen nicht ausreichend nähern können, um eine Relaxationsverstärkung zu erfahren [7, 18]. Hierzu ist eine Annähe-

rung auf ca. 5 Å [76] bzw. 3 Å [18] nötig. In Lösung befindliches Deoxyhämoglobin bewirkt somit keine Relaxationsverstärkung. Bestätigt wurde dieses durch Untersuchungen u. a. von Brooks und Mitarbeiter [18]. Darüberhinaus wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß sowohl oxygenierte als auch deoxygenierte Vollblutproben gleiche T_1 -Werte aufwiesen.

Lagerungsuntersuchungen an Erythrozytenkonzentraten belegen eine Zunahme des Sauerstoffpartialdruckes in den Erythrozytenkonzentraten bei Fortschreiten der Lagerung und, bedingt durch den Abfall des 2,3 BPG, eine Abnahme des p50, des Sauerstoffpartialdruckes, bei dem das Hämoglobin zu 50% mit Sauerstoff gesättigt ist [79, 108]. Nach der Sauerstoffbindungskurve nimmt folglich der Anteil des deoxygenierten Hämoglobins im Laufe der Lagerung ab. Betrachtet man die überwiegend vorliegenden Hämoglobinderivate der Erythrozytenkonzentrate, so würde die Lagerung eine Reduktion der paramagnetischen Relaxation bewirken. Eine Erklärung der von uns beobachteten Zunahme der Längsrelaxationsrate durch Änderungen des Oxygenierungsgerades während der Lagerung ist folglich anhand obiger Überlegungen nicht möglich.

zu 3: In der Literatur sind zahlreiche Arbeiten zu KSR-Untersuchungen an Hämatomen bekannt, in denen die Wirkungen des Methämoglobins intensiv diskutiert werden [4, 15, 17, 18, 27, 49, 88, 105, 106, 107, 110]. Eine Zunahme der Konzentration an Methämoglobin (oxidiertes Hämoglobin) hat bedeutende Auswirkungen auf das Relaxationsverhalten von Blut. Bei der Umwandlung von Hämoglobin zu Methämoglobin kommt es zu einem intrazellulären Konzentrationsanstieg des Methämoglobins. Durch die High-Spin-Konfiguration besitzt das Methämoglobin eine stark paramagnetische Eigenschaft (s. Kap. 1.4) [19, 36]. Konformationsänderungen im Methämoglobin führen zu einer Verkürzung der Distanz zwischen Wassermolekül und paramagnetischem Zentrum und erlauben dadurch eine leichtere Interaktion der 5 ungepaarten Elektronen mit den Protonen des umgebenden Wassers [13, 76]. Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, hat die paramagnetische Relaxation durch Dipol-Dipol-Interaktion zwischen den Protonen des Wassers und dem ungepaartem Elektronenspin eine Zunahme von $1/T_1$ und $1/T_2$ zur Folge [13, 76, 19].

Da in dem untersuchten Sediment der Erythrozytenkonzentrate neben dem zellulären Anteil auch Additivlösung zu finden ist, muß auch die Diffusion von Wasser aus der Lösung in den Erythrozyten berücksichtigt werden. Durch die Differenz in der magnetischen Suszeptilibität zwischen Zytoplasma und Lösungsmedium entsteht eine lokale Inhomogenität des Magnetfeldes; das lokale Magnetfeld innerhalb des Erythrozyten ist stärker als außerhalb. Die Protonen der Wassermoleküle, die durch die Erythrozytenmembran diffundieren, dephasieren. Dadurch kommt es zum Zerfall des Quermagnetisierungsvektors (Verlust der Phasenkohärenz) und somit zu einer Zunahme der Querrelaxationsrate $1/T_2$. Ein intrazellulärer Methämoglobinanstieg würde sich somit als Anstieg von $1/T_2$ bemerkbar machen. Bass und Mitarbeiter [7] und Di Chiro und Mitarbeiter [34] beschreiben in Vollblutproben eine lineare Zunahme der Querrelaxationsrate mit steigender intrazellulärer Methämoglobinkonzentration. Dieser Ef-
Taber und Mitarbeiter [105] untersuchten die Methämoglobinbildung in Vollblut. Hierbei ließ sich während des 28tägigen Untersuchungszeitraumes bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C keine Neuentstehung von Methämoglobin nachweisen (Methämoglobinanteil am Gesamthämoglobin bei Lagerungsbeginn: $0,37 \pm 0,11\%$, nach 28 Tagen Lagerung: $0,44 \pm 0,18\%$, n = 11). Bei einer Lagerungstemperatur von 25 °C wurde erst nach 11 Tagen Lagerung ein Anstieg der Methämoglobinkonzentration registriert [105]. Unter vergleichbaren technischen Bedingungen bestimmten Bass und Mitarbeiter [7] die Relaxationsraten von Blutproben mit unterschiedlichem Methämoglobingehalt, erzeugt durch Zugabe von Natriumnitrit. Die Kontrollproben hatten eine Methämoglobinkonzentration zwischen 0% und 1,8%. Die Längsrelaxationsrate dieser Proben betrug 0,83 \pm 0,13 s⁻¹ und ist somit vergleichbar mit den Meßergebnissen unserer Proben zu Beginn der Lagerung. Es zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen dem Methämoglobingehalt der Probe und der Längsrelaxationsrate. Bei einer Methemoglobinkonzentration von nahezu 100% wurde ein $1/T_1$ von 2,2 s⁻¹ ermittelt. Wendet man die Parameter der Regressionsgeraden auf unsere Daten an, so müßten die Proben der 7. Lagerungswoche bei der gemessenen Längsrelaxationsrate von $1,1 \pm 0,08$ s⁻¹ bereits eine Methämoglobinkonzentration von ca. 15% haben. Bei den Proben der 15. Lagerungswoche würde man beim gemessenen $1/T_1$ -Wert von $1,3 \pm 0.07$ s⁻¹ eine Methämoglobinkonzentration von ca. 40% voraussetzen. Diese Werte liegen weit oberhalb der Methämoglobinkonzentrationen gelagerter Erythrozytenkonzentrate. Eine Methämoglobinbildung kann aus o.g. Überlegungen somit nicht für die beobachteten Relaxationsveränderungen verantwortlich sein.

4.3 Weitere mögliche Einflußgrößen auf die Ergebnisse der Kernspin-Resonanz-Untersuchungen

Neben den paramagnetischen Effekten könnten weitere, lagerungsbedingte Veränderungen der Erythrozytenkonzentrate ursächlich für die Zunahme der Längsrelaxationsrate sein. Bekannt ist der Einfluß des pH-Wertes sowie eine Variation in der Packungsdichte auf die Relaxationseigenschaften von Blut.

Die Lagerung der untersuchten Erythrozytenkonzentrate sollte unter einer konstant niedrigen Temperatur von 4 ± 2 °C erfolgen, um einen Qualitätsverlust durch Temperaturschwankungen zu vermeiden. Somit war es notwendig, den Lagerungsbeuteln 20 ml messende Einzelproben zu jedem Untersuchungstag zu entnehmen. Das Beutelvolumen nahm folglich an jedem Meßtag um den entsprechenden Betrag ab. Die kontinuierliche Zunahme der Längsrelaxationsrate könnte somit lediglich Ausdruck der systematischen Änderung der Lagerungsbedingungen durch die

ständige Abnahme des Verhältnisses Konserveninhalt zu Konservenoberfläche sein. Dieses kann ausgeschlossen werden, da vor der standardisierten Serie Lagerungsbeutel unterschiedlichen Alters direkt, ohne vorherige Manipulation, untersucht wurden. Hier betrug die Längsrelaxationsrate bei einem 29 Tage alten Erythrozytenkonzentrat 0,95 s⁻¹, bei 51 Tage bzw. 79 Tage alten Blutbeuteln 1,10 bzw. 1,35 s⁻¹. Die Zunahme der Relaxationsraten 1/T₁ entsprachen somit Werten aus unserem Kollektiv.

Der pH-Wert beeinflußt den Ladungszustand eines Proteins und damit auch die Hydratationsschicht der Erythrozytenoberfläche und des Hämoglobins [16]. Die pH-Wert-Bestimmungen in der Addiditivlösung PAGGS-M, sowie Angaben aus der Literatur [79], belegen einen Abfall des pH-Wertes während der Lagerung, wenngleich durch die ATP-abhängigen Protonenpumpen des Erythrozyten davon auszugehen ist, daß die intrazelluläre Abnahme des pH-Wertes wenn überhaupt, dann wesentlich geringer ausfällt. Eine Korrelation der Längsrelaxationsrate mit dem pH-Wert ist, bedingt durch die unterschiedlichen Probenkollektive, nicht möglich. Der beobachtete pH-Wert Abfall von 7,2 auf 6,5 ist jedoch nicht als ursächlich für den Abfall der Längsrelaxationsrate anzunehmen, da die daraus resultierende Abnahme der negativen Nettoladung des Hämoglobins einen Abfall von 1/T₁ erwarten ließe und nicht den beobachteten Anstieg. So bewirkt nach Brooks und Mitarbeitern [16] ein Anstieg des pH-Wertes im Blut um eine Einheit einen Anstieg der Relaxationsraten $1/T_1$ und $1/T_2$ um ca. 30%. Gomori und Mitarbeiter [48] untersuchten die Abhängigkeit der Relaxationszeiten vom pH-Wert unter ähnlichen Bedingungen wie in dieser Studie (1,5 T, Untersuchung gepackter Erythrozyten) und beobachteten keine Relaxationsveränderungen bei moderaten Unterschieden der pH-Werte. Erst deutliche Differenzen (Anstieg von pH 5,9 auf 9,0) bewirken eine Zunahme der Relaxationsraten, vornehmlich von $1/T_2$.

Eine unterschiedliche *Packungsdichte* würde durch Viskositätsveränderungen in dem Meßvolumen die Ergebnisse der KSR-Untersuchung beeinflussen. Um reproduzierbare Bedingungen bei den KSR-Untersuchungen zu gewährleisten, führten wir die Untersuchungen in 20 ml messenden Einzelproben durch, die jeweils bei 2000 U/min zentrifugiert wurden. Schwankungen der Zentrifugationsparameter zwischen 1500 und 2500 U/min (einer Variation zwischen 380 g und 1050 g entsprechend) haben keinen signifikanten Einfluß auf die Relaxationsraten, wie der hierzu durchgeführte Versuch dokumentiert (Tab. 3).

Zerstörung der Zellintegrität durch *Hämolyse* verändert das Relaxationsverhalten von Blutproben [7, 49, 87]. Nach Loos und de Korte [79] beträgt die mittlere Hämolyserate der Erythrozyten nach 49tägiger Lagerung in PAGGS-M lediglich 0,9%. Um die Tendenz der Auswirkungen von Hämolyse auf die Relaxationszeiten abzuschätzen, betrachteten wir Proben in denen neben intakten Erythrozyten auch durch Schockgefrierung hämolysierte Erythrozyten vorlagen. Bestimmt wurden die Relaxationszeiten auch hier im Sediment, also der Mischung aus intakten Erythrozyten und Membranfragmenten sowie denaturiertem Hämoglobin. Es zeigte sich eine Zunahme von $1/T_1$ und eine Abnahme von $1/T_2$. Inwieweit das denaturierte Hämoglobin im Meßvolumen die Ergebnisse beinflußt, muß dabei offen bleiben

Diskutiert man die Auswirkung einer Hämolyse anhand der Literatur, so läßt sich die höhere Längsrelaxationsrate anteilig durch die höhere Dichte an Membranbestandteilen im Meßvolumen erklären mit rascherem Energietransfer der Spins auf das Gitter. Die Quermagnetisierung wird durch die Reduktion lokaler Feldinhomogenitäten aufgrund der Reduktion des Hydratationswassers und durch die gleichmäßigere Verteilung der Hämoglobinkonzentration in dem Meßvolumen länger aufrecht erhalten [17, 18, 40]. Änderungen des Erythrozytenvolumens erklären die Effekte nicht, da das *MCV* während der ersten 10 Wochen der Lagerung nur geringfügig varierte und erst danach anstieg. Dieses zeigten auch die Ergebnissen von Zielow und Mitarbeitern [121], die ein konstantes MCV bei 42tägiger Lagerung in PAGGS-M beobachteten. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Sullivan und Mitarbeitern [104] zeigte sich keine Abhängigkeit der Relaxationsraten vom MCV bzw. MCHC der Blutproben.

Zeitabhängige qualitative Änderungen der Beschaffenheit gelagerter Erythrozytenkonzentrate, im Sinne nur unzureichend spezifizierbarer Änderungen der molekularen erythrozytären Textur mit Bildung von MDA führen zu einer parallelen Zunahme der Längsrelaxationsrate in der Kernspin-Resonanz-Untersuchung. Demgemäß lautet unsere Arbeitshypothese, daß unter standardisierten Bedingungen eine Zunahme der Längsrelaxationsrate als Ausdruck von oxidativen Prozessen der Untersuchungsmatrix "Erythrozytenkonzentrat" aufzufassen und quantifizierbar sein könnte.

Die oxidativen Prozesse werden bei der unspezifischen Methode der Kernspin-Resonanz nur einen Teilaspekt darstellen, doch gerade durch die integrative Messung könnte die Kernspin-Resonanz-Untersuchung von Erythrozytenkonzentraten durch frühzeitige und nicht-invasive Erfassung von Schäden der Erythrozyten eine neue Methode in der Qualitätskontrolle von Erythrozytenkonzentraten bieten. Auch könnten etablierte und sich in Entwicklung befindliche Additivlösungen auf ihre membranprotektiven und zellstabilisierenden Eigenschaften hin untersucht werden. Ob sich dieses Ziel realisieren läßt, müßten weitere Untersuchungen erweisen. Hierzu würden auch Untersuchungen an Erythrozytenkonzentraten unter Zusatz zytoprotektiver Antioxidantien zählen.

5 Zusammenfassung

Während der Lagerung von Erythrozytenkonzentraten finden Veränderungen der zellulären Blutbestandteile statt, die auch bei Verwendung additiver Schutz- und Nährlösungen zunächst zum reversiblen, anschließend auch zum irreversiblen Vitalitätsverlust führen. Durch neuere Arbeiten wurde die Rolle der Lipidperoxidation beim Alterungsprozeß von Erythrozyten hervorgehoben. Die Bestimmung der Abbauprodukte der Lipidperoxidation, z. B. des Malondialdehyds, dient als ein Qualitätsparameter in der Beurteilung der Güte einer Additivlösung, unterliegt jedoch einer Vielzahl störender Einflüsse und zeigt eine insgesamt schlechte Reproduzierbarkeit.

Für die Herstellung und Lagerungshaltung hochwertiger Erythrozytenkonzentrate wäre eine nicht-invasive, sensitive Methode zur frühzeitigen Qualitätskontrolle dieser Erythrozytenkonzentrate wünschenswert.

Eine Möglichkeit, Veränderungen der Integrität der Erythrozyten sowie Konformationsänderungen des Hämoglobins nicht-invasiv zu erfassen, bietet die Kernspin-Resonanz, da die makromolekulare Beschaffenheit der Erythrozyten sowie das Hämoglobin im Erythrozyten einen direkten Einfluß auf meßbare Relaxationseigenschaften hat. Die bisher publizierten Arbeiten beschäftigten sich jedoch vornehmlich mit dem Relaxationsverhalten von Vollblutproben, die bei Raumtemperatur bzw. bei 37 °C gelagert wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Relaxationsverhalten von Blutproben untersucht, deren Zusammensetzung und Konservierung den Bedingungen einer vorschriftsmäßigen Lagerung von Erythrozytenkonzentraten entsprachen. Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob die Kernspin-Resonanz frühzeitig und nicht-invasiv Schäden der Erythrozyten erfassen kann und damit als eine neue Methode in der Qualitätskontrolle von Erythrozytenkonzentraten dienen könnte. Untersucht wurden Erythrozytenkonzentrate von 30 gesunden Spendern. Die mehrwöchige Lagerung der Erythrozyten erfolgte in der Additivlösung PAGGS-M bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C. Im Suspensionsmedium von zehn dieser Erythrozytenkonzentrate wurde Malondialdehyd, ein stabiles Endprodukt der Lipidperoxidation, parallel zu den KSR-Untersuchungen quantifiziert und diente so als indirekte Nachweismethode oxidativer Prozesse.

Die Malondialdehydbestimmung zeigte aufgrund der stattfindenden Lipidperoxidation einen steten Anstieg der MDA-Konzentration über den Untersuchungszeitraum. Bei der Untersuchung mittels Kernspin-Resonanz zeigte die Längsrelaxationsrate $1/T_1$ ebenfalls von Beginn der Lagerung an eine kontinuierliche Zunahme, während die Querrelaxationsrate $1/T_2$ über dem gesamten Untersuchungszeitraum hinweg konstant blieb. Dabei korrelierten die Malondialdehyd-Konzentrationen und die Längsrelaxationsraten $1/T_1$ hoch signifikant. Experimentell konnte bei einer Provokation oxidativer Prozesse, hervorgerufen durch Zugabe von Wasserstoffperoxid, eine rasche Zunahme der Längsrelaxation $1/T_1$ bei ebenfalls konstanter Querrelaxation $1/T_2$ nachgewiesen werden. Dieses ist konsistent mit dem in der Literatur diskutierten sogenannten two-fraction-fast-exchange-Model, daß $1/T_1$ wesentlich durch Wechselwirkungen zwischen den Makromolekülen und dem gebundenen Wasser der Membranhydratationsschicht bestimmt wird. Die Querrelaxation $1/T_2$ wird hauptsächlich durch die Wechselwirkungen der Protonen mit den magnetischen Eigenschaften des Hämoglobins in der Zelle bestimmt. Relaxationsraten-Erhöhungen von $1/T_1$ und $1/T_2$ würde daher die Folge einer relativen Zunahme des dreiwertigen Eisens (Methämoglobinentstehung) sein.

Die Längsrelaxationsrate $1/T_1$ stellt einen weiteren Parameter für Beurteilung der Viabilität von gelagerten Erythrozyten dar, der mit oxidativen Prozessen korreliert ist. Demgemäß könnte die Kernspin-Resonanz-Untersuchungen eine Möglichkeit eröffnen, sowohl frühzeitig und nicht-invasiv die Produktqualität von Erythrozytenkonzentraten mit hoher Empfindlichkeit zu überprüfen als auch eine Aussage über die Eignung additiver Lösungen zur Erythrozytenkonservation zu treffen.

6 Literaturverzeichnis

- 1. Akerblom O, Kreuger A: Studies on citrate-phosphate-dextrose (CPD) blood suplement with adenine. Vox Sang 29:90-95, 1975
- Ando K, Beppu M, Kikugawa K: Evidence for accumulation of lipid hydroperoxides during the aging of human red blood cells in the circulation. Biol Pharm Bull 18:659-663, 1995
- **3.** Asnar J, Santos MT, Valles J, Sala J: Serum malondialdehyde-like material (MDA-LM) in acute myocardial infarction. J Clin Paqthol 36:712-715, 1983
- 4. Barkovich AJ, Atlas SW: Magnetic resonance imaging of intracranial hemorrhage. Radiologic clinics of North America Vol 26, No 4:801-820, 1988
- 5. Bartosz G: Erythrocyte aging: physical and chemical membrane changes. Gerontology 37:33-67, 1991
- Bartosz G: Erythrocyte membrane changes during aging in vivo. In Blood Cell Biochemistry, Volume 1, Erythroid Cells, Harris JR (ed.), pp 45-79, Plenum Press, New York, 1990
- Bass J, Sostman HD, Boyko O, Koepke JA: Effects of cell membrane disruption on the relaxation rates of blood and clot with various methemoglobin concentrations. Invest Radiol 25:1232-1237, 1990
- Bäumler H, Radtke H, Franz B, Tofote U, Pawlow I, Kiesewetter H: Comparative investigations of quality of erythrocyte concentrates in preservation media SAG-M, PAGGS-M and Adsol without and with leukocyte depletion. Beitr Infusionsther Transfusionsmed 34:58-62, 1997
- 9. Berger TM, Polidori MC, Dabbagh A, Evans PJ, Halliwell B, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Frei B: Antioxidant activity of vitamin C in iron-overloaded human plasma. J Biol Chem 272:15656-15660, 1997
- 10. Bottomley PA, Foster TH, Argersinger RE, Pfeifer LM: A review of normal tissue hydrogen NMR relaxation times and relaxation mechanisms from 1-100 MHz: dependence on tissue type, NMR frequency, temperature, species, excision, and age. Med Phys 11:425-448, 1984
- Bottomly PA, Hardy CJ, Argersinger RE, Allen-Moore G: A review of 1H nuclear magnetic resonance relaxation in pathology: Are T1 and T2 diagnostic? Med. Phys. 14:1-36, 1987
- Bradley WG, Schmidt PG: Effect of methemoglobin formation on the MR-appearance of subarachnoid hemorrhage. Radiology 156:99-103, 1985

- Bradley WG: MRI of hemorrhage and iron in the brain. In: Stark DD, Bradley WG (eds.) Magnetic resonance imaging. Mosby, St. Louis, 1988
- 14. Brewer GJ, Eaton J: Erythrocyte metabolism interaction with oxygen transport. Science 171:1205-1211, 1971
- **15.** Brindle KM, Brown FF, Campbell ID, Grathwohl C, Kuchel PW: Application of spinecho nuclear magnetic resonance to whole-cell systems. Biochem J 180:37-44, 1979
- Brooks RA, Battocletti JH, Sances A Jr, Larson SJ, Bowman RL, Kudravcev V. Nuclear magnetic relaxation in blood. IEEE Trans Biomed Eng 22:12-18, 1975
- 17. Brooks RA, Di Chiro G, Patronas N: MR imaging of cerebral hematomas at different field strength: theory and applications. J Comput Assist Tomogr 13:194-206, 1989
- **18.** Brooks RA, Di Chiro G: Magnetic resonance of stationary blood: a review. Med Phys 14:903-913, 1987
- **19.** Bryant RG, Marill K, Blackmore C, Francis C: Magnetic relaxation in blood and blood clots. Magn Reson Med 13:133-144, 1990
- **20.** Burk RF, Lane JM: Ethane production and liver necrosis in rats after administration of drugs and other chemicals. Toxicol Appl Pharmacol 50:467-478, 1979
- **21.** Card RT, Fergusson DJ: Relationship of stored red cell deformability to survivability following transfusion: in vitro prediction of in vivo viability . Blood 70:327 (abstract), 1987
- **22.** Card RT, Mohandas N, Mollison PL: Relationship of post transfusion viability to deformability of stored red cells. Br J Haematol 53:237-240, 1983
- Card RT: Red cell membrane changes during storage. Transfusion Med Rev 2:40-47, 1988
- 24. Carmen RA, Sohmer PR, Lewis LM, et al.: Five-week red cell storage with preservation of 2,3 DPG. Transfusion 28:157-161, 1988
- 25. Cerutti PA: Oxy-radicals and cancer. Lancet 344:862-863, 1994
- **26.** Chiu D, Kuypers F, Lubin B: Lipid peroxidation in human red cells. Semin Hematol 26:257-276, 1989
- 27. Clark RA, Watanabe AT, Bradley WG, Roberts JD: Acute hematomas: Effects of deoxygenation, hematocrit, and fibrin-clot formation and retraction on T2 shortening. Radiology 175:201-206, 1990
- **28.** Claster S, Chiu DTY, Quintanilha A et al.: Neutrophils mediate lipid peroxidation in human red cells. Blood 64:1079-1084, 1984
- 29. Clemens MR, Waller HD: Lipid peroxidation in erythrocytes. Chem Phys Lipids 45:251-268, 1987

- **30.** Cohen MD, McGuire W, Cory DA, Smith JA: MR appearance of blood and blood products: an in vitro study. AJR 146:1293-1297, 1986
- **31.** Conlon T, Outhred R: Water diffusion permeability of erythrocytes using an NMR technique. Biochim Biophys Acta 288:354-361, 1972
- **32.** Das SK, Nair RC: Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation of normal and sickled erythrocytes. Br J Haematol 44:87-92, 1980
- **33.** Daskiewicz OK, Hennel JW, Lubas B, Szczepkowski TW: Proton magnetic relaxation and protein hydration, Nature 200:1006-1007, 1963
- **34.** Di Chiro G, Brooks RA, Girton GE, Caporale G, Wright C, Dwyer J, Horne III K: Sequential MR studies of intracerebral hematomas in monkeys. AJNR 7:193-199, 1986
- Draper HH, Hadley M: Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Meth Enzymol 186:421-431, 1990
- **36.** Eisenstadt M: NMR relaxation of protein and water protons in diamagnetic hemoglobin solutions. Biochem 24:3407-3421, 1984
- **37.** Esterbauer H, Cheeseman KH: Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Meth Enzymol 186:407-421, 1990
- **38.** Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H: Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Rad Biol Med 11:81-128, 1991
- **39.** Feuerstein H, StibenzD: Banking related decline of erythrocyte N-acetyl-neuraminic acid and phospholipids. Haematologia 15:205-209, 1982
- **40.** Finnie M, Fullerton GD, Cameron IL: Molecular masking and unmasking of the paramagnetic effect of iron on the proton spin-lattice (T1) relaxation time in blood and blood clots. Magnetic resonance imaging Vol 4:305-310, 1986
- **41.** Fullerton GD, Cameron IL, Ord VA: Frequency dependence of magnetic resonance spinlattice relaxation of protons in biological materials. Radiology 151:135-138, 1984
- **42.** Fullerton GD, Ord VA, Cameron IL: An evaluation of the hydration of lysozyme by an NMR titration method, Biochim Biophys Acta 869:230-246, 1986
- Fullerton GD, Physiologic basis of magnetic relaxation. In: Stark DD, Bradley WG (eds.) Magnetic Resonance Imaging. Mosby, St. Louis, 1988
- **44.** Fullerton GD, Potter JL, Dornbluth NC: NMR relaxing of protons in tissues and other macromolecular water solutions. Magn Reson Imaging 1:209-226, 1982
- **45.** Fullerton GD, Seitz PK, Hazelwood CF: Applications of the fast proton diffusion model to evaluation of water in artemia cysts. Physiol Chem Phys Med NMR 15:489-499, 1983
- **46.** Gasparovic C, Matwiyoff NA: The magnetic properties and water dynamics of the red blood cell: a study by proton-nmr lineshape analysis. Magn Reson Med 26:274-299, 1992

- 47. Ghosh BK, Rosenthal JS, Winston A: Changes in spin-lattice (T1) and spin-spin (T2) relaxation times of packed red blood cell samples during sixty days at room temperature. Ann NY Acad Sci 612:559-560, 1990
- **48.** Gomori JM, Grossman RI, Asakura T, Schnall MD, Atlas S, Holland G, Mittl RL Jr: An in vitro study of magnetization transfer and relaxation rates of hematoma. AJNR 14:871-880, 1993
- **49.** Gomori JM, Grossman RI, Yu-Ip C, Asakura T: NMR relaxation times of blood: dependence on field strength, oxidation state and cell integrity. J Comput Assist Tomogr 11:684-690, 1987
- 50. Greenwalt TJ, Bryan DJ, Dumaswala UJ: Erythrocyte membrane vesiculation and changes in membrane composition during storage in citrate-phosphate-dextrose-adenine-1. Vox Sang 47:261-270, 1984
- **51.** Grosch L, Noack F: NMR relaxation investigation of water mobility in aqueous bovine serum albumin solutions. Biochim Biophys Acta 453:218-232, 1976
- **52.** Gutteridge JMC, Quinlan GJ: Malondialdehyde formation from lipid peroxides in the thiobarbituric acid test: the role of lipid radicals, iron salts, and metal chelators. J Appl Biochem 5:293-299, 1983
- **53.** Gutteridge JMC: Free radical damage to lipids, amino acids, carbohydrates and nucleic acids determined by thiobarbituric acid reactivity. Int J Biochem 14:649-653, 1982
- **54.** Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE: Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? J Lab Clin Med 119:598-620, 1992
- **55.** Halliwell B, Gutteridge JMC: Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. FEBS Lett 128:347-352, 1981
- **56.** Halliwell B, Gutterridge JMC: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals, and disease. Biochem J 219:1-14, 1984
- 57. Halliwell B: Antioxidants in human health and disease. Annu Rev Nutr 16:33-50, 1996
- 58. Halliwell B: Free radicals and antioxidants: a personal view. Nutr Rev 52:253-265, 1994
- **59.** Halliwell B: Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lancet 344:721-724, 1994
- **60.** Halliwell B: Oxygen radicals: A common-sense look at their nature and medical importance. Med Biol 62:71-77, 1984
- **61.** Heaton WA: Evaluation of posttransfusion recovery and survival of transfused red cells. Transfus Med Rev 6:153-169, 1992
- **62.** Hebbel RP, Eaton JW, Balasingam M, Steinberg MH: Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. J Clin Invest 70:1253-1259, 1982

- Hershko C: Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. Semin Hematol 26:277-285, 1989
- **64.** Hochstein P, Jain SK: Association of lipid peroxidation and polymerization of membrane proteins with erythrocyte aging. Fed Proc 40:183-188, 1981
- **65.** Hogman CF, deVerdier CH, Ericson A: Studies on the mechanism of human red cell loss of viability during storage at +4°C in vitro I. Cell shape and total adenylate concentration as determinant factors for post transfusion survival. Vox Sang 48:257-268, 1985
- **66.** Humad S, Zarling EJ, Skosey JL: Lipid Peroxidation in rheumatoid arthritis. Measurement of pentane in breath samples by gas chromatography. Clin Res 33:919, 1985
- **67.** James TL: Nuclear magnetic resonance in biochemistry, pp. 15-64, 173-234. Academic Press, New York, 1975
- **68.** Janero DR: Malonaldehyde and thiobabituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Rad Biol Med 9:515-540, 1990
- 69. Karplus M, Rossky P: Solvation: a molecular dynamics study of a dipeptide in water. In Rowland SP, editor: American Chemical Society No. 127, Washington D.C., pp. 23-42, 1980
- **70.** Kleef in den JJE, Cuppen JJM: RLSQ: T1, T2 and p calculations, combining ratios and least squares. Magn Reson Med 5:513-524, 1987
- **71.** Knight JA, Blaylock RC, Searles DA: Effect of vitamins C and E on lipid peroxidation in stored erythrocytes. Ann Clin Lab Sci 23:51-56,1993
- 72. Knight JA, Piper RK, Smith SE, Kinder VE, Crockett HH: Increased urinary lipoperoxides in drug abusers. Ann Clin Lab Sci 18:374-377, 1988
- **73.** Knight JA, Pleper RK, McClellan L: Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. Clin Chem 34:2433-2438, 1988
- **74.** Knight JA, Searles DA, Blaylock RC: Lipid peroxidation compared in stored whole blood with various nutrient-anticoagulant solutions. Ann Clin Lab Sci 23:178-183,1993
- **75.** Knight JA, Voorhees BS, Martin L: The effect of metal chelators on lipid peroxidation in stored erythrocytes. Ann Clin Lab Sci 22:207-213, 1992
- **76.** Koenig SH, Brown RD: The Importance of the motion of water for magnetic resonance imaging. Invest Radiol 20:297-305, 1985
- 77. Laczko J, Szabolcs M, Jona I: Vesicle release from erythrocytes during storage and failure of rejuvenation to restore cell morphology. Haematologia 18:233-247, 1985
- **78.** Lindstrom TR, Koenig SH: Magnetic-field-dependent water proton spin-lattice relaxation rates of hemoglobin solutions and whole blood. J Magn Res 15:344-353, 1974

- 79. Loos JA, de Korte D: In vitro comparison of the metabolic, physical and serological characteristics of red cell suspensions in storage solutions containing PAGGS-Mannitol, SAGM or CPDA-1 plasma. Clinical Expert Protocol, NPBI protocol nr. 26-1000/0, 1993
- 80. Matsuzaki K, Takano H, Tokunaga K, Inaba S, Hamasaki N: Clinical application of phosphoenolpyruvat (PEP) to autologous transfusion of patients with open heart surgery. Fokuoka Acta Med 84:7-14, 1993
- 81. Matthes G, Strunk S, Siems W, Grune T: Posttransfusional changes of 2,3diphosphoglycerate and nucleotides in CPD-SAGM-preserved erythrozytes. Infusionsther Transfusionsmed 20:89-92, 1993
- 82. Matthes G, Strunk S, Storek W, Strauss D: P-31 NMR studies of in vivo regeneration of preservative-induced changes in 2,3-diphosphoglycerate content of erythrocytes. Beitr Infusionsther 26:76-80, 1990
- Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M: Blood transfusion in Clinical Medicine, Blackwell, Oxford, 1993
- Mollison PL: Blood transfusion in Clinical Medicine, Blackwell, Oxford, pp 141-142, 1983
- Moore GL: Additive solutions for better blood preservation. Crit Rev Clin Lab Sci 25:211-229, 1987
- **86.** Murphy S: Similarities amongst the events occuring during the storage of red cells and platelets for transfusion. Transfusion Med Rev 1:138-143, 1987
- Nummi P, Alanen A, Nanto V, Kormano M: Effect of hemolysis and clotting on proton relaxation times of blood. Acta Radiol Diagn Stockh 27:225-230, 1986
- **88.** Packer KJ: The effects of diffusion through locally inhomogeneous magnetic fields on transverse nuclear spin relaxation in heterogeneous systems: proton transverse relaxation in striated muscle-tissue. J Magn Reson 9:438-443, 1973
- 89. Rice-Evans C: Iron-mediated oxidative stress and erythrocytes. In Blood Cell Biochemistry, Volume 1, Erythroid Cells, Harris JR (ed.), pp 429-436, Plenum Press, New York, 1990
- **90.** Ross JF, Finch CA, Peacock WC et al.: The in vitro preservation and post-transfusion survival of stored blood. J Clin Invest 26:687-703, 1947
- **91.** Saint-Blancard J, Allery M, Fabre G, Noel L, Leterrier F: Properties of red blood cell concentrates stored in PAGGS-sorbitol. Ann Pharm Fr 53:220-229, 1995
- 92. Saltman P: Oxidative stress: a radical view. Semin Hematol 26:249-256, 1989
- **93.** Scarpa M, Rigo A, Mono F, Isacchi G, Novelli G, Dallapiccola B: Increased rate of superoxide ion generation in fanconia anemia erythrozytes. Biochem Biophys Res Commun 130:127-132, 1985

- 94. Schacter LP: Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide by erythrocytes from individuals with sickle cell trait or normal hemoglobin. Eur J Clin Invest 16:204-210, 1986
- **95.** Sheetz MP, Chan SI: Proton magnetic resonance studies of whole human erythrocyte membranes. Biochemistry 11:548-555, 1972
- **96.** Sinnhuber RO, Yu TC, Chang YT: Characterization of the red pigment formed in the thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. Food Res 23:626-633, 1958
- 97. Sipponen JT, Sepponen RE, Sivula A: Nuclear magnetic resonance imaging of intracerebral hematomas in the acute and resolving phases. J Comput Assist Tomogr 7:954-959, 1983
- **98.** Snyder LM, Fairbanks G, Trainor J: Properties and characterization of vesicles released by young and old human red cells. Br J Haematol 59:513-522, 1985
- 99. Solomon I, Relaxation processes in a system of two spins. Phys. Rev. 99:559-565, 1955
- 100. Stern A: Drug induced oxidative denaturation in red blood cells. Semin Hematol 26:301-306, 1989
- **101.** Stocks J, Dormandy TL: The autooxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. Brit J Hematol 20:95-111, 1971
- **102.** Stocks J, Kemp M, Dormandy TL: Increased susceptibility of autooxidation of red-bloodcell lipids to autooxidation in haemolytic states. Lancet 1:266-269, 1971
- **103.** Stocks J, Offerman EL, Modell CB, Dormandy TL: The susceptibility of autooxidation of human red cell lipids in health and disease. Br J Haematol 23:713-724, 1972
- 104. Sullivan SG, Stern A, Rosenthal JS, Minkoff LA, Winston A: NMR water-proton spinlattice relaxation time of human red blood cells and red blood cell suspensions. FEBS Lett 234:349-352, 1988
- **105.** Taber KH, Migliore PJ, Pagani JJ, McLauren T, Hayman LA: Temporal changes in the oxidation state in in vitro blood. Invest Radiol 25:240-244, 1990
- 106. Toshihiko E, Shoji N, Yoshiharu H, Chuzo T, Toshihiro H: Nonacute subdural hematoma: Fundamental interpretation of MR images based on biochemical and in vitro MR analysis. Radiology 171:449-453, 1989
- 107. Unger EC, Cohen MS, Brown TR: Gradient echo imaging of hemorrhage at 1,5 T. Magn Res Imag 7:163-172, 1989
- 108. v. Eisenhart-Rothe B. et al.: Sauerstoffaffinität und Regenerationsfähigkeit in SAG-M und PAGGS-M gelagerter Erythrozyten. Beitr Infusionstherapie, Vol 30, Karger, Basel: 136-139, 1992
- **109.** Van Dyke BR, Saltman P: Hemoglobin: a mechanism for the generation of hydroxyl radicals. 2:985-989, 1996

- **110.** Vymazal J, Bulte JW et al.: Frequency dependence of MR relaxation times. I. Paramagnetic ions. J Magn Imaging 3:637-640, 1993
- 111. Wagner GM, Chiu DTY, Yee MC: Red cell veciculation a common membrane physiologic event. J Lab Clin Med 108:315-324, 1986
- 112. Walker WH, Netz M, Gänshirt KH: 49 Tage Lagerung von Erythrozytenkonzentraten in Blutbeuteln mit der Konservierungslösung PAGGS-Mannitol. Beitr Infusionstherapie, Vol 26, Karger, Basel: 55-59, 1990
- 113. Wardman P, Candeias LP: Fenton chemistry: an introduction. Radiat Res 145:523-531, 1996
- **114.** Weiss SJ: The role of superoxide in the destruction of erythrocyte targets by human neutrophils. J Biol Chem 255:9912-9917, 1980
- **115.** Wendel A, Feuerstein S, Konz K-H: Acute paracetamol intoxication of starved mice leads to lipid peroxidation in vivo. Biochem Pharmacol 28:2051-2055, 1979
- **116.** Wolfe LC: Oxidative injuries to the red cell membrane during conventional blood preservation. Semin Hematol 26:307-312, 1989
- **117.** Wolfe LC: The membrane and the lesions of storage in preserved red cells. Transfusion 25:185-203, 1985
- **118.** Wolfe LC: The red cell membrane and the storage lesion. Clinics Haematol 14:259-276, 1985
- **119.** Yasaka T, Ohya I, Matsumoto J, Shiramizu T, Sasaguri Y: Accelleration of lipid peroxidation in human paraquat poisoning. Arch Intern Med 141:1169-1171, 1981
- **120.** Ye FQ, Allen PS: Relaxation enhancement of the transverse magnetization of water protons in the paramagnetic suspensions of red blood cells. MRM 34:713-720, 1995
- 121. Zilow EP, Zilow G, Ruef P, Linderkamp O: Rheologic changes in stored erythrocyte concentrates. Beitr Infusionstherapie, Vol 33, Karger, Basel: 136-140, 1997

7 Anhang

7.1 Grundlagen der Kernspin-Resonanz

Die Kernspin- oder Magnetische Resonanz (KSR) ist ein Effekt, der 1946 von Purcell und Bloch unabhängig voneinander beschrieben wurde. Die sich daraus ergebenden Spektroskopiemethoden erwiesen sich als wichtiges Mittel der Forschung in physikalischer Chemie und Biochemie. Durch Nutzung räumlich kodierter Signale wurde Anfang der siebziger Jahre die Kernspin-Resonanz-Tomographie entwickelt, die heute als nichtinvasives bildgebendes Verfahren aus der radiologischen Diagnostik nicht mehr wegzudenken ist.

Zu den Grundeigenschaften der Elementarteilchen wie Protonen und Neutronen gehört der Eigendrehimpuls oder Spin. Nur Atomkerne mit einer in der Summe ungeraden Anzahl von Protonen und Neutronen haben einen resultierenden Eigendrehimpuls.

Befindet sich ein Atomkern mit resultierendem Eigendrehimpuls (Spin) bzw. magnetischem Moment in einem Magnetfeld, erfährt er ein Drehmoment, das ihn zur Präzession um die Richtung des Magnetfeldes zwingt. Dabei stellt die parallele gegenüber der antiparallelen Ausrichtung der Atomkerne den energieärmeren Zustand dar. Mit Hilfe einer elektromagnetischen Welle, deren Frequenz genau der Präzessionsfrequenz (=Lamorfrequenz) entspricht, kann die energiereichere antiparallele Ausrichtung durch Absorption elektromagnetischer Energie erreicht werden. Nach Abschalten der elektromagnetischen Welle fällt der Atomkern mit einer gewissen Verzögerung (Relaxation) in den energieärmeren Zustand zurück unter Aussendung eines elektromagnetischen Signals mit der charakteristischen Lamorfrequenz. Die Lamorfrequenz (ω) ist direkt proportional der magnetischen Flußdichte B₀ (SI-Einheit Tesla [T]) und dem gyromagnetischen Faktor g (6):

$$\omega = g * B_0 \tag{6}$$

Der Wert des gyromagnetischen Faktors hängt vom charakteristischen Aufbau des betreffenden Kerns ab. Er hat im Falle des Wasserstoffisotops ¹H den Wert $g/2\pi = 42,56$ MHzT⁻¹.

Wird ein Ensemble von Kernen mit resultierendem Spin in ein Magnetfeld gebracht, treten die magnetischen Momente der einzelnen Kerne in Wechselwirkung mit dem anregenden Feld und erzeugen ein im makroskopischen Bereich nachweisbares magnetisches Moment (Magnetisierung).

Als Folge wird der entartete Energiezustand proportional zur magnetischen Flußdichte aufgespalten. Nach der Boltzmannstatistik ist der niedrigere Energiezustand stärker besetzt als der höhere. Durch Hochfrequenz(HF)-Pulse, die der energetischen Differenz der Zustände entsprechen, erfolgt eine Anregung vom niedrigeren in den höheren Energiezustand. Das nachfolgende Relaxieren in den Gleichgewichtszustand, hervorgerufen durch die sogenannte Spin-GitterRelaxation, erfolgt unter Energieabgabe bei gleicher Frequenz wie bei der Anregung, d.h. es tritt ein Resonanzphänomen auf. Nach einer kollektiven Anregung des betrachteten Systems werden die Resonanzsignale mit Hilfe einer hochempfindlichen Spule gemessen. Sie spiegeln die magnetischen Eigenschaften der atomaren und molekularen Umgebung des betrachteten Kernkollektivs wider. Unsere Untersuchungen an Erythrozytenkonzentraten basieren auf der Resonanz von ¹H, d.h. im wesentlichen der Protonenresonanz von Wasser. Die Wechselwirkungen der betrachteten Kerne mit der Umgebung finden ihren Ausdruck in den KSR-Parametern Spin-Gitter-Relaxationszeit (T_1), auch Längs- oder longitudinale Relaxationszeit genannt und Spin-Spin-Relaxationszeit (T_2), auch Quer- oder transversale Relaxationszeit genannt.

Nach Anregung kehrt die Längsmagnetisierung M_z exponentiell in die Ausgangslage zurück (die z-Achse ist die Längsachse des Tomographen, die x- und y-Achsen die dazugehörigen rechtwinkligen Koordinaten) und erreicht ihren Gleichgewichtswert M_0 . Die für die Relaxation der Längsmagnetisierung charakteristische Zeit ist die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 . Sie ist ein Maßstab dafür, wie schnell Energie von den sich um die eigene Achse drehenden Kernen auf die Umgebung, das Gitter, durch zufällige Kollisionen übertragen werden kann. T_1 ist dabei die Zeitkonstante der Exponentialfunktion. Der Wert von T_1 liegt bei biologischen Geweben zwischen 50 Millisekunden und einigen wenigen Sekunden [10, 11]. T_1 ist kürzer in einer Flüssigkeit als in einem Festkörper, da die magnetische Umverteilung in Flüssigkeiten wegen der großen Beweglichkeit der Moleküle und deshalb schnelleren Übertragung der Anregungsenergie in Form von Wärmeenergie rascher eintritt.

Im Wärmegleichgewicht präzedieren in einem Magnetfeld alle Protonen mit ihrer Lamorfrequenz. Dabei sind sie in ihrer Phase unkoordiniert. Durch einen HF-Impuls werden die Protonen so angeregt, daß sie "in Phase" rotieren und einen Quermagnetisierungsvektor erzeugen, der mit der Lamorfrequenz rotiert. Durch regellose örtliche Magnetfeldvariationen, die Spin-Spin-Wechselwirkungen verursachen, kommt es zu einer Phasenverschiebung der Protonen und damit zum Zerfall des Gesamt-Quermagnetisierungsvektors M_{xy}. Die Spin-Spin-Relaxationszeit T₂ ist die Zeitkonstante der Exponentialfunktion der Quer-Magnetisierung. Die Quermagnetisierung zerfällt lange bevor die Längsmagnetisierung ihren vollen Wert erreicht hat. Wäre die Spin-Spin-Wechselwirkung der einzige Faktor, der die Phasenverschiebung bestimmte, so würde die Signaleinhüllende für die Resonanzfrequenz in ihrer Amplitude nur mit der Zeitkonstante T₂ abfallen. Die Ungleichförmigkeit des Hauptmagnetfeldes verursacht jedoch eine zusätzliche Phasenverschiebung. Infolgedessen fällt die Einhüllende des Signals mit einer Zeitkonstante ab, die kleiner als T2 ist, genannt T2*. Das tatsächliche T2 wird durch eine sogenannte Spin-Echosequenz erzeugt. T₂ ist sehr kurz in Festkörpern, da festgebundene Moleküle örtliche Feldabweichungen aufrechterhalten, so daß es zu einem schnellen Phasenverlust kommt. In Flüssigkeiten wird die Quermagnetisierung für eine längere Zeit aufrechterhalten. Wegen des funktionalen Zusammenhanges des Kehrwertes der Relaxationszeiten werden in den Kapiteln "Ergebnisse" und "Diskussion" die Begriffe Relaxationsraten 1/ T_1 und 1/ T_2 benutzt.

Die Zeitkonstante T₂ wird durch die sogenannte Spin-Echo (SE)-Pulssequenz ermittelt. Wie oben erwähnt, verliert das Antwortsignal aufgrund der Inhomogenitäten des Hauptmagnetfeldes seine Kohärenz tatsächlich aber mit T_2^* . Die daraus resultierenden zusätzlichen Phasenverschiebungen werden bei der Spin-Echo-Pulssequenz eliminiert. Dazu wird ein 180°-Echo-HF-Impuls im Abstand der halben Spin-Echo Zeit ($T_{E}/2$) nach dem 90°-Anregungsimpuls angelegt. Die individuellen Magnetmomente werden mit dem Echoimpuls um 180° rotiert. Als Folge ist der Kohärenzverlust, hervorgerufen durch die systematischen Feldinhomogenitäten, nach einer weiteren Zeit von $T_E/2$ wieder ausgeglichen. Nach der Spin-Echozeit T_E wird somit die Resonanz-Signalamplitude detektiert, die nur noch durch die regellose Spin-Spin-Wechselwirkung beeinflußt ist. Durch Anwendung von weiteren 180°-Echo-Impulsen im Abstand von T_E können erneute Echos erzeugt werden, die mit der Zeitkonstate T2 in ihrer Amplitude zerfallen. Erst durch die Messung von mindestens zwei Echosignalen kann die Zeitkonstante T2, d.h. der Zerfall der Kohärenz, berechnet werden. Um das gesamte Objekt zu scannen, wird im Abstand der Repetitionszeit T_R dieser Meßzyklus wiederholt. Aus den gesamten gemessenen Resonanzamplituden erfolgt dann die Berechnung der Spin-Spin-Relaxationszeit T2 für jedes Voxelelement eines betrachteten Meßobjektes.

Um ein durch T₁ beeinflußtes Resonanzsignal zu erzeugen, wird der Magnetisierungsvektor durch die sogenannte Inversion-Recovery (IR)-Pulssequenz mittels eines gepulsten elektromagnetischen Hochfrequenzfeldes um 180° invertiert. Nach Ende des HF-Impulses fangen die Protonen an, wieder in Richtung des statischen Hauptfeldes zu relaxieren. Dabei geht die Magnetisierung M_z durch Null und baut sich dann wieder in positiver Richtung auf. Die Magnetisierung bleibt während der Relaxation in z-Richtung orientiert. Sie präzediert nicht und muß daher zur Messung von T₁ zuerst in die x-y-Ebene rotiert werden. Dies wird durch Anlegen eines 90°-Impulses, bei Lamorfrequenz, im geeigneten Moment nach dem 180°-Impuls erreicht. Auf diese Weise wird eine Magnetisierung in x-y-Ebene erzeugt, die ihrerseits ein Signal in der Spule induziert. Da es technisch sehr schwierig ist, das schwache Signal direkt nach dem 90°-Meßimpuls zu detektieren, dient ein 180°-Echo in der x-y-Ebene zur Erzeugung eines Spin-Echos, d.h. die Detektion des Meßsignals erfolgt dann entsprechend der Spin-Echosequenz. Das Intervall zwischen den 180°- und 90°-Impulsen wird als Inversionszeit T_I bezeichnet, das Intervall zwischen den 90°-Impulsen als Repetitionszeit T_R. Man braucht eine Repetitionszeit, die wesentlich länger als T₁ ist, damit die Längsrelaxation vor der Wiederholung der Inversion-Recovery-Impulsfolge abgeschlossen werden kann [70].

7.2 Additiv- und Stabilisatorlösungen

Die Lagerung von Blut ohne Stabilisator mit einem Zusatz von Heparin ist für maximal 48 Stunden möglich, da die gerinnungshemmende Wirkung von Heparin zeitlich begrenzt ist und überdies der Mangel an Nährstoffen rasch zur Hämolyse und Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der Erythrozyten führt.

Der erste für eine längere Konservierung geeignete Stabilisator war ACD-A (acid-citratedextrose). Der pH-Wert liegt nach Zugabe des Blutes bei 7,0-7,1 und nimmt im Laufe der Lagerung bis auf 6,6 ab. Die Lagerdauer mit ACD-A beträgt bei 4 °C 21 Tage.

Der niedrige pH-Wert der ACD-A-Lösung schädigt die Erythrozyten. Außerdem wurden nach Austauschtransfusionen mit ACD-A-konservierten Präparaten in Einzelfällen erhebliche Acidosen beschrieben [112].

Durch Reduktion von Citrat und Zufügen von Phosphat entstand der Stabilisator CPD (citratephosphate-dextrose). Nach Mischen mit Blut im Verhältnis 1:9 liegt der pH-Wert bei 7,1-7,2 und ist am Ende der Lagerungszeit bis auf 6,85 abgesunken. Wahrscheinlich durch den höheren pH-Wert und den Zusatz von Phosphat bedingt, wird auch der Gehalt an 2,3-BPG in CPD besser als in ACD aufrechterhalten. Für die Lagerungsdauer werden 21 Tage angegeben [85].

Der Zusatz von Adenin (Blutkonzentration 0,5 mmol) verbessert die Lebensfähigkeit der Erythrozyten derart, daß nach 35tägiger Lagerung noch 70% der Erythrozyten 24 Stunden nach Transfusion im Empfänger nachweisbar sind, bei reiner CPD-Lösung beträgt dieser Wert nach vier Wochen Lagerung lediglich 66% [1]. Die CPD-Adeninlösung wurde 1978 als Stabilisator CPDA-1 eigeführt [85].

Weite Verbreitung hat gegenwärtig die Additivlösung SAG-M (Sodium-chloride, Adenin, Glucose, Mannitol) gefunden. Die 24-Stunden Überlebenszeit wird hier mit 85% nach 35tägiger Lagerung und mit 77% nach 42tägiger Lagerung angegeben. Wir verwendeten das 1988 vorgestellte Vierfachbeutelsystem der Firma Biotrans [112], das die CPD-Lösung im Primärblutentnahmebeutel und in einem zweiten Beutel die Additivlösung PAGGS-Mannitol enthält.

Für diese Lösung und das Vorgängerprodukt PAGGS-Sorbitol liegen zahlreiche in-vitro und invivo-Untersuchungen vor, die die Lagerfähigkeit von Erythrozyten in diesen Lösungen bis 49 Tage belegen [91, 112]. Für diese Lagerungslösung wird eine 24-Stunden Überlebenszeit von mindestens 75% nach 49tägiger Lagerung angegeben [91]. Sorbitol wurde durch Mannitol aufgrund möglicher Sorbitunverträglichkeiten bei Massentransfusionen ersetzt.

Na-Zitrat 2H ₂ O	26,3 mg
Zitronensäure	3,0 mg
Glukosemonohydrat	25,5 mg
Natriumdihydrogenphosphat·H ₂ O	2,2 mg
Wasser für Injektionszwecke	ad 1 ml

Tab. 4: Zusammensetzung des CPD-Stabilisators (1 ml).

Tab. 5: Zusammensetzung der PAGGS-M-Additivlösung (1 ml).

Adenin-Hydrochlorid	0,246 mg
Guanosin	0,408 mg
Natriumdihydrogenphosphat·H ₂ O	1,11 mg
Dinatriumhydrogenphosphat·12H ₂ O	2,88 mg
Glukosemonohydrat	9,40 mg
Mannitol	10,0 mg
Natriumchlorid	4,21 mg
Wasser für Injektionszwecke	ad 1 ml

7.3 Einzelergebnisse der MDA-Bestimmungen

t [d]	Probe	Mw	SD									
ι[u]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	3,02	3,63	4,57	0,90	0,00	0,00	0,00	2,88	1,40	0,00	1,64	1,74
3	3,27	1,51	4,29	3,51	0,00	1,73	3,13	0,82	1,93	0,00	2,02	1,49
7	2,73	5,27	4,82	3,88	1,19	4,12	4,86	1,28	1,81	0,16	3,01	1,82
14	6,57	5,92	5,02	6,00	3,62	4,20	3,46	3,46	3,54	2,63	4,44	1,34
21	5,35	5,51	5,14	5,02	3,66	4,81	3,91	3,05	3,62	4,69	4,48	0,85
28	8,82	5,71	9,18	7,96	3,29	4,53	4,49	3,50	3,99	3,87	5,53	2,27
35	9,67	10,16	8,24	8,33	4,03	8,02	6,67	6,21	6,50	5,51	7,34	1,90
42	11,43	9,84	9,67	8,37	5,10	8,23	6,50	6,63	6,71	6,95	7,94	1,93

Tab. 6: MDA-Konzentration $[\mu m/l]$ der Proben in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

7.4 Einzelergebnisse der Kernspin-Resonanz-Untersuchungen

- 53 -

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
1	1090	27	142	6
4	1131	31	144	4
8	1105	22	148	5
15	1047	21	153	5
22	1019	16	151	4
29	974	18	143	5
36	909	15	141	5
50	941	16	147	6
57	871	16	147	5
71	781	10	140	4

Tab. 7: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 1 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Tab. 8: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 2 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
1	1044	23	118	4
4	1061	21	128	4
8	1082	20	134	4
15	1025	21	142	4
22	1015	21	145	4
29	928	20	134	6
36	887	14	135	5
50	870	19	133	6

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
57	807	14	135	5
71	734	10	137	5

Tab. 9: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 3 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
1	1111	28	127	4
4	1134	23	121	4
8	1154	21	137	4
15	1096	17	153	4
22	1070	19	153	4
29	966	17	143	5
36	888	17	148	5
50	846	14	145	8
57	792	13	142	5
71	734	9	143	6

Tab. 10: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 4 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
5	1074	24	128	5
8	1071	26	132	5
12	1077	21	144	4
19	1024	16	144	3
26	978	14	141	3
33	916	18	134	5

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
40	889	14	143	6
54	853	15	140	6
61	803	12	135	5
75	726	11	131	6

Tab. 11: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 5 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
32	941	15	131	5
35	1031	17	142	5
39	971	19	136	5
46	921	20	135	4
53	872	15	135	4
60	827	13	134	4
67	823	10	141	4
81	805	12	151	6
88	752	14	141	5
102	679	9	134	5

Tab. 12: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 6 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
1	1096	22	122	5
8	1097	22	133	4
15	1079	17	146	5
22	1080	21	149	5

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
29	1024	15	155	5
43	972	17	147	5
50	909	15	149	5
64	817	11	142	4

Tab. 13: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 7 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter [d]	T1 [ms]	SD	T2 [ms]	SD
1	1148	25	132	4
8	1161	25	153	5
15	1128	21	158	7
22	1103	28	155	5
29	1026	20	162	6
43	987	18	147	6
50	905	16	148	5
64	800	12	146	4

Tab. 14: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 8 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
5	1116	22	118	4
12	1107	21	140	4
19	1057	16	148	4
26	1015	21	147	4
33	946	18	150	6
47	914	16	144	7

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
54	833	16	141	6
68	752	11	139	4

Tab. 15: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 9 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
8	1053	23	105	3
15	1017	16	116	3
22	1013	17	124	3
29	966	19	126	5
36	932	16	133	4
50	880	15	135	4
57	812	14	131	5
71	742	11	130	4

Tab. 16: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 10 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
42	1002	26	120	3
49	968	17	134	4
56	944	18	139	4
63	852	14	135	4
70	822	12	142	4
84	800	12	147	4
91	750	12	141	4
105	667	10	137	4

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
12	1137	24	144	4
19	1156	22	174	5
26	1081	35	150	5
33	996	19	151	5
47	981	20	144	5
54	909	18	145	6
68	855	14	143	5

Tab. 17: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 11 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Tab. 18: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 12 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
4	1051	20	133	4
11	1100	17	142	4
18	1048	24	141	6
25	991	18	147	5
39	942	19	140	6
46	876	14	143	5
60	771	10	140	5
67	702	9	128	4
74	705	10	141	5
81	657	10	135	4

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
4	1152	22	136	4
11	1091	29	144	6
18	1019	20	147	6
32	1025	21	144	6
39	954	22	141	6
53	881	16	138	5
60	772	12	124	5
67	771	17	138	5
74	720	12	127	4

Tab. 19: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 13 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Tab. 20: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 14 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
4	1091	15	134	4
11	1067	21	140	6
18	1005	21	142	6
32	1011	18	146	6
39	944	22	141	6
53	851	12	136	5
60	744	10	130	5
67	759	14	132	6
74	713	11	128	4

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
4	1148	25	131	5
11	1104	25	133	5
18	1025	22	141	6
32	1051	21	147	6
39	1021	23	147	5
53	925	16	142	4
60	793	13	133	4
67	794	13	134	5
74	737	12	128	4

Tab. 21: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 15 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Tab. 22: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 16 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
4	1126	16	150	4
11	1089	23	149	6
18	991	19	141	6
32	982	18	142	6
39	925	14	142	6
53	869	13	140	5
60	761	12	124	4
67	776	11	140	5
74	729	11	130	4

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
1	1126	21	140	4
8	1050	31	125	5
15	1020	21	137	5
29	948	22	132	5
36	959	19	141	7
50	849	14	132	5
57	769	13	118	5
64	782	12	132	4
71	717	11	122	4
78	712	10	130	4

Tab. 23: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 17 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Tab. 24: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 18 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
1	1126	14	121	4
8	1198	32	139	6
22	1117	25	156	6
29	993	24	144	6
36	1015	25	154	6
43	931	18	145	5
50	903	17	142	5

Tab. 25: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 19 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter $\begin{bmatrix} d \end{bmatrix} = I_1 \begin{bmatrix} ms \end{bmatrix} = SD = I_2 \begin{bmatrix} ms \end{bmatrix} = SI$	Alter [d]	T_1 [ms]	SD	$T_2 [ms]$	SD
---	-----------	------------	----	------------	----

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
1	1062	32	112	5
8	1110	27	134	6
22	1027	19	142	6
29	888	17	127	5
36	929	19	139	5
43	843	17	128	4
50	828	15	130	5

Tab. 26: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 20 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
4	1079	23	116	4
18	1038	23	138	5
25	880	17	122	5
32	909	14	131	4
39	830	15	123	5
46	799	15	124	4

Tab. 27: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 21 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
1	1115	22	155	5
7	976	18	133	5
21	933	18	131	5
28	935	17	135	4
35	929	20	132	5

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
42	887	21	128	5
77	789	13	126	4

Tab. 28: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 22 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
1	1067	20	150	7
7	962	22	134	5
21	900	19	131	4
28	894	14	131	4
35	880	21	128	5
42	856	19	126	6
77	781	18	123	4

Tab. 29: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 23 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
1	1112	23	157	6
7	989	19	129	5
21	941	18	132	5
28	920	18	133	4
35	915	20	132	5
42	846	19	128	5
77	795	13	122	4

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
1	1118	26	144	6
7	1014	25	148	6
21	992	19	140	5
28	977	20	142	5
35	952	19	135	5
42	920	17	136	5
77	822	13	134	4

Tab. 30: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 24 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Tab. 31: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 25 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
1	1169	26	152	5
7	1048	24	154	7
21	1008	18	143	6
28	964	20	142	5
35	972	25	139	6
42	934	18	136	5
77	838	16	133	4

Tab. 32: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 26 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
1	1117	19	143	5
7	979	21	120	4
21	949	16	126	5

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
28	965	18	133	4
35	976	21	134	6
42	921	23	133	5
77	845	11	128	3

Tab. 33: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 27 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
1	1128	25	145	6
7	993	18	116	4
21	946	19	127	4
28	975	23	132	5
35	972	23	134	5
42	896	19	129	5
77	789	14	128	5

Tab. 34: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 28 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
1	1120	26	140	5
7	995	23	135	5
21	961	19	142	5
28	910	20	133	4
35	885	24	128	4
42	847	18	122	5
77	810	15	122	3

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
1	1032	20	125	4
7	963	17	127	5
21	937	18	123	4
28	915	17	127	4
35	933	32	127	5
42	882	20	127	5

Tab. 35: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 29 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Tab. 36: T_1 und T_2 [ms] der Kernspin-Resonanz-Untersuchung der Probe 30 in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

Alter [d]	T ₁ [ms]	SD	T ₂ [ms]	SD
1	1060	19	119	3
7	972	20	121	4
21	934	17	120	5
28	920	15	127	5
35	923	19	128	6
42	876	17	125	5
77	792	15	120	4

7.5 Einzelergebnisse der hämatologischen Parameter

Tab. 37: EK-S, Nr. 1: Hämoglobinkonzentration (Hb [g/dl]), mittleres corpuskuläre Volumen der Erythrozyten (MCV [fl]) und mittlere corpuskuläre Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC [g/dl]) in Abhängigkeit von der Lagerungszeit [Tage].

- 67 -

Alter [d]	Hb [g/dl]	MCV [fl]	MCHC [g/dl]
15	15,4	88,8	33,7
22	15,6	89,0	33,3
29	15,6	89,5	33,2
36	15,5	89,2	33,1
50	15,5	91,8	32,4
57	15,4	91,7	32,2
71	15,4	95,9	30,3
Mw. ± SD	$15,5 \pm 0,1$	$90,8 \pm 2,6$	$32,6 \pm 1,1$

Tab. 38: EK-S, Nr. 2: Legendentext wie bei Tab. 37.

Alter [d]	Hb [g/dl]	MCV [fl]	MCHC [g/dl]
15	15,4	95,9	30,3
22	15,2	86,5	32,5
29	15,2	86,4	32,6
36	15,2	86,7	32,5
50	15,1	88,1	32,1
57	15,0	87,6	32,1
71	15,0	90,7	30,9
Mw. ± SD	$15,2 \pm 0,1$	88,8 ± 3.5	31,9 ± 0,9

Alter [d]	Hb [g/dl]	MCV [fl]	MCHC [g/dl]
15	15,0	90,7	30,9
22	14,2	91,9	32,6
29	14,2	91,6	32,5
36	14,3	91,6	33,0
50	14,1	94,5	32,4
57	14,0	94,4	31,5
71	14,2	98,3	30,3
Mw. ± SD	$14,3 \pm 0,3$	$93,3 \pm 2,7$	$31,9 \pm 1,0$

Tab. 39: EK-S, Nr. 3: Legendentext wie bei Tab. 37.

Tab. 40: EK-S, Nr. 4: Legendentext wie bei Tab. 37.

Alter [d]	Hb [g/dl]	MCV [fl]	MCHC [g/dl]
19	14,2	98,3	30,3
26	14,8	89,4	33,5
33	14,9	89,0	33,7
40	14,8	89,2	33,5
54	14,7	90,8	33,3
61	14,8	91,7	32,5
75	14,7	94,6	31,4
Mw. ± SD	$14,7 \pm 0,2$	91,9 ± 3,5	32,6 ± 1,3

Tab. 41: EK-S, Nr. 5: Legendentext wie bei Tab. 37.

Alter [d]	Hb [g/dl]	MCV [fl]	MCHC [g/dl]
46	14,7	94,6	31,4
53	13,6	88,8	32,7
60	13,6	88,4	33,0

Alter [d]	Hb [g/dl]	MCV [fl]	MCHC [g/dl]
67	13,6	90,0	32,5
81	13,6	92,5	31,9
88	13,6	92,6	31,6
102	13,6	93,0	31,3
Mw. ± SD	$13,8 \pm 0,4$	91,4 ± 2,4	$32,0 \pm 0,7$

Tab. 41: EK-S, Nr. 6: Legendentext wie bei Tab. 37.

Alter [d]	Hb [g/dl]	MCV [fl]	MCHC [g/dl]
8	13,6	93,0	31,3
15	14,3	85,7	32,9
22	14,3	85,5	33,3
29	14,3	85,7	33,1
43	14,4	86,5	33,1
50	14,3	86,4	32,8
64	14,3	88,3	32,1
Mw. ± SD	$14,2 \pm 0,3$	$87,3 \pm 2,7$	$32,7 \pm 0,7$

Tab. 42: EK-S, Nr. 7: Legendentext wie bei Tab. 37.

Alter [d]	Hb [g/dl]	MCV [fl]	MCHC [g/dl]
8	14,3	88,3	32,1
15	12,6	89,8	32,6
22	12,7	91,5	32,3
29	12,7	90,2	32,7
43	12,7	91,0	32,9
50	12,6	90,8	32,1
64	12,7	92,8	31,9
Alter [d]	Hb [g/dl]	MCV [fl]	MCHC [g/dl]
-----------	----------------	------------	----------------
Mw. ± SD	$12,7 \pm 0,6$	90,6 ± 1,4	$32,4 \pm 0,4$

Tab. 43: EK-S, Nr. 8: Legendentext wie bei Tab. 37.

Alter [d]	Hb [g/dl]	MCV [fl]	MCHC [g/dl]
12	12,7	92,8	31,9
19	12,4	85,3	33,2
26	12,4	85,5	33,2
33	12,4	85,5	33,3
47	12,2	86,5	32,6
54	12,4	85,7	33,1
68	12,3	87,6	31,9
Mw. ± SD	$12,4 \pm 0,2$	87,0 ± 2,7	$32,7 \pm 0,6$

Tab. 44: EK-S, Nr. 9: Legendentext wie bei Tab. 37.

Alter [d]	Hb [g/dl]	MCV [fl]	MCHC [g/dl]
15	12,3	87,6	31,9
22	14,9	88,3	33,6
29	14,8	87,9	33,6
36	14,8	88,2	33,2
50	14,7	89,3	33,1
57	14,6	89,7	32,6
71	14,7	92,5	31,9
Mw. ± SD	$14,4 \pm 0,9$	89,1 ± 1,7	$32,8 \pm 0,7$

Tab. 45: EK-S, 2	Nr. 10: Legendentext wie bei Tab. 37.

- 71 -

Alter [d]	Hb [g/dl]	MCV [fl]	MCHC [g/dl]
49	14,7	92,5	31,9
56	13,5	96,4	33,0
63	13,6	96,9	33,2
70	13,7	98,1	32,9
84	13,5	102,2	31,5
91	13,5	102,7	31,3
105	13,5	106,8	30,0
Mw. ± SD	$13,7 \pm 0,4$	99,4 ± 4,8	$32,0 \pm 1,2$

Tab. 46: EK-S, Nr. 11: Legendentext wie bei Tab. 37.

Alter [d]	Hb [g/dl]	MCV [fl]	MCHC [g/dl]
12	11,4	90,0	32,6
19	11,4	89,9	33,0
26	11,4	88,7	33,5
33	11,3	89,2	33,4
47	11,3	89,4	33,4
54	11,3	89,0	33,5
68	11,3	89,9	33,2
Mw. ± SD	$11,3 \pm 0,1$	$89,4 \pm 0,5$	$33,3 \pm 0,4$

Tab. 47: EK-S, Nr. 12: Legendentext wie bei Tab. 37.

Alter [d]	Hb [g/dl]	MCV [fl]	MCHC [g/dl]
4	11,3	89,9	33,2
11	15,0	97,8	33,2
18	15,1	98,8	33,2

Alter [d]	Hb [g/dl]	MCV [fl]	MCHC [g/dl]
25	14,9	99,1	32,8
39	14,9	102,9	31,8
46	14,8	102,6	31,8
60	14,8	104,5	31,2
Mw. ± SD	14,4 ± 1,4	$99,3 \pm 4,9$	$32,5 \pm 0,8$

Tab. 48: EK-S, Nr. 13: Legendentext wie bei Tab. 37.

Alter [d]	Hb [g/dl]	MCV [fl]	MCHC [g/dl]
4	14,0	83,3	33,8
11	14,1	83,8	33,4
18	14,1	83,6	33,5
32	14,2	85,8	33,3
39	14,0	84,1	33,3
53	14,1	85,8	32,7
Mw. ± SD	$14,1 \pm 0,1$	84,4 ± 1,1	$33,3 \pm 0,4$

Tab. 49: EK-S, Nr. 14: Legendentext wie bei Tab. 37.

Alter [d]	Hb [g/dl]	MCV [fl]	MCHC [g/dl]
4	13,7	86,2	33,5
11	14,5	87,1	33,1
18	14,6	86,7	33,7
32	14,6	88,2	33,2
39	14,5	87,5	33,0
53	14,2	88,4	31,8
Mw. ± SD	$14,4 \pm 0,4$	$87,4 \pm 0,9$	$33,0 \pm 0,7$

Alter [d]	Hb [g/dl]	MCV [fl]	MCHC [g/dl]
4	10,5	86,9	33,3
11	15,9	88,6	33,1
18	15,3	87,8	33,2
32	15,2	88,6	33,0
39	15,2	87,6	33,1
53	15,2	89,1	32,2

 $14,6 \pm 0,2$ $88,1 \pm 0,8$

 $33,0 \pm 0,4$

- 73 -

Tab. 50: EK-S, Nr. 15: Legendentext wie bei Tab. 37.

 $Mw. \pm SD$

8 Lebenslauf

Am 31. März 1970 wurde ich in Hamburg als Sohn von Dr. rer. pol. Gerhard und Barbara Bleckmann, geb. Stein, geboren. Nach dem Besuch der Grundschule Islandstraße 1976-1980 und dem Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife am Gymnasium Meiendorf in Hamburg 1989 erfolgte die Ableistung des Grundwehrdienstes. Dann schloß sich das Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg von 1990 bis 1996 mit Abschluß der 3. Ärztlichen Prüfung im April 1996 an. Anschließend Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Klinik für Nuklearmedizin des Allgemeinen Krankenhauses St. Georg in Hamburg von Mai 1996 bis Oktober 1997. Tätigkeit als Praxisassistent in der Gemeinschaftspraxis Dres. med. Adam/Selle/Franke in Hamburg Oktober bis Dezember 1997. Seit Januar 1998 Tätigkeit als Assistenzarzt an der Abteilung für Nuklearmedizin des Universitäts-Klinikums Hamburg-Eppendorf.

9 Danksagung

Mein Dank geht an den ehemaligen Direktor der Abteilung für Medizinische Biochemie, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. E. E. Gabbe, für die Möglichkeit einen großen Teil dieser interdisziplinären Arbeit in seinem Institut - unterstützt von Herrn Dr. rer. nat. R. Fischer und Herrn Dr. rer. nat. R. Engelhardt - durchführen zu können. Herrn Priv.-Doz. Dr. med. E. E. Gabbe möchte ich insbesondere für seine aktive und gestaltende Förderung sowie für die kritischen Diskussionen bei der Verfassung dieser Arbeit danken.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. H.-P. Benn, damals in Oberarztfunktion der Abteilung für Transfusionsmedizin des UKE tätig, danke ich besonders für die Entwicklung der Idee der vorliegenden Arbeit, für seine konstruktiven Anregungen sowie für die wertvolle Verknüpfung mit der Abteilung für Medizinische Biochemie des UKE.

Sehr verbunden bin ich Herrn Prof. Dr. med. P. Kühnl, Direktor der Abteilung für Transfusionsmedizin, für die Möglichkeit, die dort speziell hergestellten Blutkomponenten nutzen zu können.

Herrn Dr. A. Sputtek aus der Abteilung für Transfusionsmedizin danke ich für die hilfreichen Hinweise nach Durchsicht der Arbeit.

Dem derzeitigen Direktor der Abteilung für Röntgendiagnostik der Radiologischen Klinik, Herrn Prof. Dr. med. E. Bücheler danke ich für die großzügige und kooperative Nutzungsmöglichkeit des Kerspin-Tomographens der Radiologischen Klinik.

Abschließend danke ich Herrn Dr. rer. nat. R. Engelhardt für seine professionelle und unablässige Hilfestellung bei der experimentellen Durchführung der Kernspin-Resonanz-Untersuchungen sowie für die anregende Diskussion des theoretischen Hintergrundes.