

» Kryokonservierung von Erythrozyten mit Hydroxyethylstärke (HES) – Vom Laborversuch zur klinischen Anwendung

Zusammenfassung. Die Kryokonservierung von Erythrozyten (RBC) ist angebracht bei Patienten mit seltenen Blutgruppen und Problemen mit multiplen Antikörpern. Sie kann darüber hinaus angebracht sein zur Überbrückung von Engpässen bei zivilen oder militärischen Katastrophen. Zusätzlich könnte sie zu Quarantäne-zwecken genutzt werden. In der praktischen Routine kann die Kryokonservierung dazu beitragen, den Verfall von Eigenblutkonserven für Elektiveingriffe zu verringern. Im Gegensatz zum etablierten Kryoprotektiv Glycerin muss das Kolloid HES nach dem Auftauen nicht herausgewaschen werden.

Methoden und Ergebnisse: Nach zahlreichen in vitro und tierexperimentellen Experimenten wurden bei 7 Freiwilligen die ersten Re-Transfusionen der mit dem neuen optimierten HES-Protokoll hergestellten Eigenblutkonserven durchgeführt. Therapeutisch angewendet wurde das Verfahren zum ersten Mal bei einer 16jährigen Patientin. Vor einigen Jahren wurde eine systematische klinische Phase-II-Studie abgeschlossen, die die Überprüfung der Sicherheit und Verträglichkeit von mittels HES kryokonservierten autologen Erythrozyten-Konzentraten (EK) zum Ziel hatte. Jeweils das erste (EK), das von 36 Patienten erhalten worden war, die sich einer präoperativen Eigenblutentnahme unterzogen hatten, war randomisiert 3 Gruppen zugeordnet worden. Gruppe 1: Konventionelle Flüssiglagerung bei 4°C in PAGGS-M, Gruppen 2 und 3: Kryokonservierung mittels Flüssigstickstoff und HES (MW 200.000, MS 0,5, Endkonzentration 11,5 Gewichts-%). Gruppe 2: Re-Transfusion nach Waschen der aufgetauten Konserve, Gruppe 3: ohne Waschen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede nach autologer Re-Transfusion im Hinblick auf Hämodynamik, Blutgasparameter und Gewebsoxygenierung in den drei Gruppen gefunden. Es wurden auch keine schwerwiegenden Nebenwirkungen bei der Re-Transfusion der gewaschenen oder ungewaschenen kryokonservierten RBC gesehen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Gabe eines mittels HES kryokonservierten autologen EK sicher ist und gut vertragen wird. **Ausblick:** Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Effekte zu untersuchen, die bei der Gabe größerer Volumina homologer, mittels HES kryokonservierter RBC auftreten können.

Schlüsselwörter: Erythrozyten – Transfusion – Kryokonservierung – Hydroxyethylstärke

A. Spüttek¹, E.-P. Horn², J. Schulte am Esch², P. Kühnl¹

¹ Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Abteilung für Transfusionsmedizin und

² Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Hamburg

Cryopreservation of red blood cells using hydroxyethyl starch (HES) – From laboratory investigations to clinical application. Introduction: Cryopreservation of red blood cells (RBC) is appropriate in case of rare blood groups, problems due to multiple antibodies and possibly as an interim aid during temporary shortages, especially in case of civil or military disasters. Additionally, RBC deep freezing may be useful for quarantine purposes. For routine clinical practice, cryopreservation may help to overcome the outdating of autologous blood deposits for elective surgery. In contrast to the established cryoprotectant glycerol, the colloid HES need not be removed after thawing. **Methods and results:** After in vitro and animal experiments, autologous studies using an optimised HES protocol were carried out on 7 healthy volunteers. The first clinical application was the case of a 16 year old female patient. Recently, a clinical study to determine the safety and tolerance of red blood cells cryopreserved with the HES has been performed. The first RBC concentrate obtained from each of 36 patients undergoing preoperative autologous blood donation was randomly assigned to the conventional storage method (4°C, PAGGS-mannitol = group 1) or to cryopreservation with HES (MW = 200,000, MS = 0.5) at a final concentration of 11.5% (w/w) using liquid nitrogen (= groups 2, 3). Group 2: postthaw washing step, group 3: no postthaw washing step. No significant differences after autologous re-infusion of the respective unit between the 3 groups could be detected regarding hemodynamic or blood gas parameters and tissue oxygenation. No adverse reactions after reinfusion of washed or unwashed cryopreserved RBC were observed. The data suggested that the administration of one autologous unit of RBC after cryopreservation with HES is safe and well tolerated. **Outlook:** Further investigations are necessary to evaluate the effects of the transfusion of larger volumes of homologous HES cryopreserved RBC.

Key words: Red blood cells – Transfusion – Cryopreservation – Hydroxyethyl starch

Einleitung

Bislang wird die Kryokonservierung von Erythrozyten bei Patienten mit seltenen Blutgruppenmerkmalen oder Problemen mit multiplen Antikörpern eingesetzt. Denkbar ist aber auch die Überbrückung temporärer Engpässe, insbesondere in Katastrophenfällen. Zusätzlich können RBC aber auch zu Quarantäne-Zwecken eingefroren werden, eine in der BRD für Blutplasma bereits gesetzlich vorgeschriebene Maßnahme zur Verringerung des Infektionsrisikos, wenn keine Verfahren

zur Virusinaktivierung eingesetzt werden. Außerdem kann die Kryokonservierung von RBC dazu beitragen, bei der Eigenblutgewinnung den präoperativen Sammelzeitraum auszudehnen, der ansonsten wegen der begrenzten Haltbarkeit der EK (max. 49 Tage) häufig für eine ausreichende Konservenanzahl (ohne Anämisierung am OP-Termin) zu kurz ist oder das mühselige „Bocksprungverfahren“ erforderlich macht. Die Chancen für spekulative Eigenblut-Depots sind schwer abzuschätzen: Immerhin steigt die Transfusionswahrscheinlichkeit ab dem 65. Lebensjahr deutlich an [1], so dass sich die Möglichkeit ergibt, vor dem Erreichen dieses Alters ein Eigenblutdepot anzulegen. – In dieser Übersicht wird die Entwicklung eines Verfahrens, das HES anstatt des bisher üblichen Glycerins als Kryoprotektiv verwendet, beschrieben. Im Gegensatz zum Glycerin muss das bereits in der Infusionstherapie seit Jahrzehnten bewährte Kolloid HES vor der Transfusion nicht unbedingt entfernt werden. Falls es doch entfernt werden soll, so gelingt dies sehr viel schneller und einfacher als beim Glycerin, da HES als Makromolekül nicht in die Zellen eindringt. Gelegentlich kann sogar die Wirkung des Kolloids HES als Volumenersatzmittel (z.B. bei Hypovolämie und Blutverlust) durchaus erwünscht sein. Die seit der Erstbeschreibung [2] bis zur Mitte der achtziger Jahre bekannten Techniken hatten wegen zu geringer Wiederfindungsrate, zu hoher Hämolyse- und zu schlechter Reproduzierbarkeit noch nicht zu Verfahren geführt, die eine klinische Anwendung zuließen.

Untersuchungen und Ergebnisse

In-vitro-Untersuchungen

Ziel dieser Untersuchungen war zunächst, die das Verfahren beeinflussenden Parameter zu ermitteln, sie zu optimieren und die Reproduzierbarkeit zu erhöhen [3].

So wurde gefunden, dass bei einer ausreichend gründlichen Vorbereitung (3 Wäschen vor dem Einfrieren) auch nach einer Woche als CPD-A Vollblutkonserve gelagerten RBC noch Wiederfindungsraten nach dem Auftauen von 90% (gemessen mit dem „saline stability“-Test) erzielt werden konnten. Da dieser „Wascheffekt“ mit zunehmendem Konserventalter zunahm, ist zu vermuten, dass ein dosierter Stress zur Zerstörung und Entfernung weniger vitaler (vermutlich älterer) Blutkörperchen führte.

Weiterhin wurden die Zusammensetzung der kryoprotektiven Lösung (hinsichtlich HES-Konzentration und Elektrolytgehalt) und die Temperaturführung beim Abkühlen und Wiedererwärmen optimiert. Es besteht nämlich eine Abhängigkeit der Wiederfindungsrate nach dem Auftauen von der HES-Konzentration, dem Elektrolytgehalt sowie der Kühlrate. Weiterhin spielten der Hkt und die HES-Modifikation eine Rolle. Die besten Ergebnisse wurden – bei Vorgabe eines anwendungsorientierten Hkt von 40% – mit einer Kühlrate von 220 K/min und einer HES-Konzentrationen von ca. 11,5 Gew.-% HES erzielt. Die optimale Elektrolytkonzentration im Extrazellulärraum betrug dabei 75 mmol/l. Dies wurde durch die Zugabe einer 23,3 Gew.-% HES enthaltenden Lösung mit einem Elektrolytgehalt von 60 mmol/l zum gewaschenen RBC-Konzentrat (Hkt ca. 80%) erreicht.

Die RBC, die den optimierten Konservierungsprozess überstehen – und das sind ca. 90% – unterscheiden sich in ihrer

Qualität hinsichtlich biochemischer und das Sauerstoffbindungsverhalten beschreibender Parameter nicht nennenswert von frischen „Nativerythrozyten“.

Aus Untersuchungen, in denen abweichend von den Empfehlungen eine Lagertemperatur von nur -80°C gewählt worden war, ist bekannt, dass bei dieser Temperatur sowohl mit einer geringeren zahlenmäßigen Wiederfindung, als auch einer Verringerung der Glucose-Utilisation und Membranstabilität zu rechnen ist [4]. Diese Ergebnisse passten zu den aus differenzialthermoanalytischen Untersuchungen [5] zu extrapolierenden Daten, die zeigten, dass bei -80°C innerhalb von ca. 100 Tagen mit einer Verringerung der Wiederfindungsrate um 10% zu rechnen ist. Um eine Abschätzung der Lagerstabilität von mit HES kryokonservierten RBC unterhalb von -130°C vorzunehmen, wurden kryokonservierte und über einen langen Zeitraum gelagerte Proben aufgetaut, von denen identisch behandelte „Zwillingsproben“ bereits zu einem sehr viel früheren Zeitpunkt aufgetaut und untersucht worden waren. Die Referenzproben wiesen bei einer durchschnittlichen Aufbewahrung von 0 bis 40 Tagen vor dem Auftauen eine Wiederfindungsrate von $92\% \pm 2\%$ auf. Der Unterschied zu den bis zu 4 Jahren gelagerten Proben betrug weniger als 1% ($n=8$). 9 weitere Proben, die im Durchschnitt beinahe 3 Jahre gelagert worden waren, wiesen nach dem Auftauen ebenfalls Wiederfindungsraten von $90\% \pm 2\%$ auf.

Tierexperimentelle Untersuchungen

In der ersten Versuchserie wurde Hunden $\frac{1}{6}$ ihres Blutvolumens entnommen, die RBC mit dem HES-Verfahren tiefgefroren und nach einer Zeitspanne von einigen Wochen autolog retransfundierte [6]. Darüber hinaus konnte in Isotopen-Studien mittels ^{51}Cr -Markierung gezeigt werden, dass sich die 24-Stunden-Überlebensrate ($>95\%$) und die In-vivo-Überlebensrate (ca. 120 Tage) von kryokonservierten und ungefrorenen Blutkörperchen nicht unterschieden [7].

Klinische Studien

In einer Phase-I-Studie wurden bei 7 Freiwilligen die kryokonservierten RBC aus einer Vollblutentnahme vor der Re-Infusion zunächst einmalig „gewaschen“, d. h. das Schutzadditiv und der geringe Prozentsatz der zerstörten Zellen zum Großteil entfernt. In einer zweiten Serie wurde wiederum bei den gleichen 7 Freiwilligen nach dem Auftauen jeweils eine Konserve direkt ohne weitere Maßnahmen zusammen mit dem Kryoprotektiv HES re-transfundierte [8]. Alle Versuchspersonen vertrugen die Re-Transfusion der kryokonservierten Eigenblutkonserven problemlos. Die nach der Verabreichung in engem zeitlichen Abstand erfassten Laborwerte zu Blutbild, Gerinnung, Nieren- und Leberfunktion zeigten keine relevanten Veränderungen.

Die erste klinische Anwendung ohne einen Waschschriff nach dem Auftauen erfolgte bei einer 16jährigen Patientin als „gezielte ärztliche Heilmaßnahme“, wobei 3 mittels LN_2 in 11,5% HES tiefgefrorene autologe RBC-Konzentrate re-transfundierte wurden [9]. Die Patientin vertrug die Re-Transfusionen ohne Probleme und konnte nach komplikationslosem postoperativem Verlauf nach Hause entlassen werden.

Inzwischen wurde eine systematische und von der Ethikkommission genehmigte Phase-II-Studie an 36 Patienten abge-

geschlossen [10]. Dazu wurden 36 Patienten, die sich in Vorbereitung auf einen elektiven chirurgischen Eingriff der Eigenblutentnahme unterzogen in 3 Gruppen randomisiert: Die RBC in Gruppe 1 wurden konventionell bei 4° C in additiver Lösung (200 ml PAGGS-Mannit) gelagert, die RBC in den Gruppen 2 und 3 wurden mit KryohaES® (200.000/0,5) in einer Konzentration von 11,5 Gew.-% HES mittels LN₂ tiefgefroren. Nach Narkoseeinleitung wurden weitere 900 ml Blut entnommen. Patienten in Gruppe 1 erhielten das flüssig gelagerte RBC, diejenigen in Gruppe 2 kryokonservierte und nach dem Auftauen mit 290 ml isotoner NaCl gewaschene RBC. Patienten in Gruppe 3 wurden die tiefgefrorenen RBC ohne Waschschrift nach dem Auftauen re-transfundierte. Um die unterschiedliche Menge an HES in allen 3 Gruppen auszugleichen, erhielten die Patienten in den Gruppen 1 und 2 zusätzlich 500 ml HAES-steril® 10%. Während der Re-Transfusionsphase und im weiteren operativen und postoperativen Verlauf wurden die Patienten engmaschig überwacht. Neben zahlreichen anderen Parametern wurden die Herzfrequenz, der mittlere arterielle Blutdruck, der zentrale Venendruck, die arteriellen Blutgase, das „freie“ Hb in Plasma und Urin und die Oxygenierung des M. quadriceps femoris (50%-pO₂) mittels Feinnadelelektrode bestimmt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den 3 Gruppen hinsichtlich der Hämodynamik, der Blutgase und der Gewebsoxygenierung mit Ausnahme eines innerhalb von 2 h wieder reversiblen Anstiegs des arteriellen Mitteldrucks um 20 mm Hg in Gruppe 3. Unerwünschte Reaktionen im Zusammenhang mit dem Studienprotokoll oder eine Hämoglobinurie nach Re-Transfusion der gewaschenen bzw. ungewaschenen kryokonservierten RBC wurden nicht beobachtet. Das „freie“ Hämoglobin in den Gruppen 2 und 3 stieg auf 60 ± 12 mg/dl bzw. 98 ± 20 mg/dl im Vergleich zu Gruppe 1 (26 ± 8 mg/dl), normalisierte sich aber spätestens innerhalb von 24 h. Die Daten zeigten, dass die autologe Re-Transfusion der kryokonservierten RBC aus einer Vollblutkonserve sicher ist und gut vertragen wird.

Ausblick

Für die Fremdbluttransfusion sind aber weitere Untersuchungen, beispielsweise in einer Phase-III-Studie, zum Nachweis der Wirksamkeit, der Verträglichkeit und der Unbedenklichkeit an größeren Patientenkollektiven, Nutzen-Risiko-Vergleich gegenüber existierenden Arzneimitteln sowie Feststellung der Indikationsgebiete“ zur Zulassung als Fertigarzneimittel noch erforderlich. Unabhängig davon soll aber zunächst eine Herstellungsgenehmigung für mittels HES kryokonservierter EK-Konzentrate bei Eigenblutpatienten beantragt werden.

Literatur

- 1 Vamvakas EC, Taswell HF. Epidemiology of blood transfusion. *Transfusion* 1994; 34: 464–470
- 2 Knorpp CT, Merchant WR, Gikas PW, Spencer HH, Thomson NM. Hydroxyethyl starch: extracellular cryoprotective agent for erythrocytes. *Science* 1967; 157: 1312–1313
- 3 Körber C, Sputtek A, Rau G. Hydroxyethylstärke – Ein neuer Weg zur Kryokonservierung von Erythrozyten. In: Mempel W, Heim MU, Pachmann (Hrsg): Tiefkühlkonservierung von Blut. München, AMV 1989: 48–59
- 4 Langer R, Emmert S, Herold T, Henrich HA. Lagerung Hydroxyethylstärke-konservierter Erythrozyten bei –80° C – Wirkung auf Membran und Energieverbrauch. In: Mempel W, Mempel M, Schwarzfischer G, Endres W (Hrsg): Eigenbluttransfusion aus heutiger Sicht. Hämatologie, München, Sympomed 1996; 5: 197–205
- 5 Spieles G, Kresin M, Loges K, Sputtek A, Heschel I, Rau G. The effect of storage temperature on the stability of frozen erythrocytes. *Cryobiology* 1995; 32: 366–378
- 6 Langer R, Düpre HJ, Kron W, Sputtek A, Steigerwald R, Trenkel K, Rau G, Henrich HA. Untersuchung zur funktionellen Verträglichkeit autologer, mit Hydroxyethylstärke kryokonservierter Erythrozyten beim Hund. In: Landgraf H, Jung F, Ehrly AM (Hrsg): Klinische Mikrozirkulation und Hämorheologie. Berlin, Blackwell Wissenschaft 1993: 233–239
- 7 Langer R, Albrecht R, Hempel K, Krug S, Sputtek A, Steigerwald R, Trenkel K, Henrich HA. Charakterisierung der 24-Stunden-Überlebensrate und Lebensdauer von mittels Hydroxyethylstärke kryokonservierten Erythrozyten nach autologer Transfusion im Hund. *Infusionsther Transfusionsmed* 1994; 21: 393–400
- 8 Sputtek A, Singbartl G, Langer R, Schleinzner W, Henrich HA, Kühnl P. Cryopreservation of red blood cells with the non-penetrating cryoprotectant hydroxyethyl starch. *Cryo-Letters* 1995; 16: 283–288
- 9 Sputtek A, Sensendorf H, Fründ V, Birmanns H, Kühnl P. Ein Fallbericht zur Kryokonservierung von Erythrozyten mit Hydroxyethylstärke (HES). In: Mempel W, Schwarzfischer G, Mempel C (Hrsg): Eigenbluttransfusion heute. Hämatologie, München, Sympomed 1995; 4: 206–211
- 10 Horn EP, Sputtek A, Standl Th, Rudolf B, Kühnl P, Schulte am Esch J. Transfusion of autologous, hydroxyethyl starch-preserved red blood cells. *Anesth Analg* 1997; 85: 739–745

Dr. Andreas Sputtek

Klinik und Poliklinik für Chirurgie
Abt. f. Transfusionsmedizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Martinistraße 52
20246 Hamburg