

Aus dem Institut für Hämostaseologie, Hämotherapie und
Transfusionsmedizin
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Rüdiger E. Scharf

Bestimmung von Phthalaten bei Stammzellspendern

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Mirjana Slijepcevic
2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. Joachim Windolf

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. Günther Giers

Zweitgutachter: Prof. Dr. Ulrich Germing

Für meine liebe Mutter

Ljubica Jankovic

1. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dem Vorhandensein von den Phthalen DEHP (Di-(2-ethylhexyl)phthalat) und seinem primären Abbauprodukt MEHP (Monoethylhexylphthalat) in Stammzellprodukten. Dabei sollte auf die Fragestellung eingegangen werden, ob Spender/innen einer peripheren Stammzellapherese erhöhten Belastungen an DEHP und MEHP ausgesetzt waren und ob bei Empfängern/innen durch die Transfusion von Stammzellprodukten erhöhte Werte an DEHP und MEHP nachgewiesen werden konnten. In diesem Zusammenhang galt es herauszufinden, ob die Lagerungszeit, die Lagerungstemperatur und verschiedene organische und nicht organische Substanzen das Migrationsverhalten der Phthalate aus PVC- haltigen Artikeln beeinflussten. Das zu diesem Zweck zufällig auserwählte Untersuchungskollektiv setzte sich aus 20 autologen peripheren Stammzellspender/innen, 21 allogenen peripheren Stammzellspendern/innen und 10 Knochenmarkspendern/innen zusammen. Indessen erfolgten die Identifizierung und die Quantifizierung des DEHP und MEHP mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie- Massenspektrometrie (LCMS). Die Ergebnisse zeigten, dass aus dem Schlauchsystem des Apheresegeräts während der Apherese das DEHP in das Blut migrierte und schließlich auch im Apheresat nachweisbar war. Damit waren Spender/ innen einer peripheren Stammzellapherese erhöhten Kontaminationen an DEHP ausgesetzt, die jedoch noch unterhalb des TDI (engl. tolerable daily intake) lagen und somit tolerabel waren. Durch Lagerungsversuche konnte gezeigt werden, dass die Migration von DEHP aus den PVC- haltigen Lagerungsbeuteln direkt mit der Lagerungstemperatur korrelierte. Desweiteren wurde nachgewiesen, dass die Dauer der Lagerung einen Einfluss auf den Gehalt an DEHP und MEHP hatte. Gelagerte organische Substanzen, insbesondere solche mit hohen zellulären Bestandteilen, beeinflussten die Migration des DEHP. In Bezug auf die Gesundheitsgefährdung der Empfänger durch die Transfusion eines Apheresats konnte geschlossen werden, dass Empfänger eines autologen Apheresats und Empfänger eines allogenen Apheresats Konzentrationen an DEHP ausgesetzt waren, die jedoch noch innerhalb des TDI lagen, somit tolerabel waren.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--|
| DEHP | Di-(2-ethylhexyl)phthalat |
| MEHP | Monoethylhexylphthalat |
| PVC | Polyvinylchlorid |
| TDI | Tolerable Daily Intake, engl. |
| NOAELs | No Observed Adverse Effect Levels, engl. |
| O ₂ | Sauerstoff |
| CO ₂ | Kohlenmonoxid |
| NaCl | Natriumchlorid |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography, engl. |
| MS | Massspectrometry, engl. |
| MRM | Multiple Reaction Monitoring, engl. |
| Hb | Hämoglobin |
| Hkt | Hämatokrit |
| CD | Cluster of Differentiation, engl. |
| TEHTM | Tri(2-Ethylhexyl)trimellitat |
| BTHC | Butyryl-trihexyl-citrate, engl. |
| ATBC | Acetyl-tri-n-butyryl-citrate, engl. |
| DINCH | Diisononylester of cyclohexanedicarboxylic acid, engl. |
| DEHA | Diethylhexyladipate, engl. |
| ACD-A | Acid-Citrat-Dextrose - A |

Inhaltsverzeichnis

| | Kapitel | Seite |
|----------|---|-------|
| 1. | Zusammenfassung | I |
| 2. | Einleitung | 1 |
| 2.1. | Phthalate | 1 |
| 2.2. | DEHP (Di-(2-ethylhexyl)phthalat) | 1 |
| 2.2.1. | Metabolismus von DEHP (Di-(2-ethylhexyl)phthalat) | 4 |
| 2.3. | Toxizität | 6 |
| 2.4. | Exposition und Risikogruppen | 7 |
| 2.5. | Alternativen zum DEHP für Blutprodukte (Di-(2-ethylhexyl)phthalat) | 9 |
| 2.6. | Spendertypen von Hämatopoetischen Stammzellen | 11 |
| 2.7. | Hämatopoetische Stammzellen | 12 |
| 2.8. | CD34 ⁺ Antigen | 13 |
| 2.9. | Zielsetzung | 14 |
| 3. | Material und Methode | 16 |
| 3.1. | Spenderkollektiv | 16 |
| 3.1.1. | Allogene Spender/innen | 16 |
| 3.1.2. | Autologe Stammzellapherese-Spender/innen | 18 |
| 3.2. | Grundlagen | 19 |
| 3.2.1. | Durchführung der Stammzellapherese | 19 |
| 3.2.2. | Durchflußzytometrische Zellanalyse | 23 |
| 3.3. | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie- Massenspektrometrie | 23 |
| 3.3.1. | Allgemeines | 23 |
| 3.3.2. | Material und Methoden | 24 |
| 3.3.2.1. | Probenvorbereitung | 24 |
| 3.3.2.2. | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie- Tandem Massenspektrometrie | 24 |
| 3.3.3. | Validierungsparameter | 27 |
| 3.3.3.1. | DEHP – Methodencharakterisierung | 27 |
| 3.4. | Versuchsaufbau | 28 |
| 4. | Ergebnisse | 31 |
| 5. | Diskussion | 55 |
| 6. | Literatur- und Quellenverzeichnis | 62 |

2. Einleitung

2.1. Phthalate

Phthalate sind Dialkyl- oder Alkylaryl Ester der 1,2-Benzoldicarbonsäure.¹ Sie können andere Materialien unter anderem auch das PVC (Polyvinylchlorid) weicher, biegsamer und zäher machen.² Gleichzeitig dienen sie dem beigefügten Medium als Stabilisierung. So bieten sie eine hervorragende Hitze- und Kälteresistenz gegenüber Sterilisationen und Kälteelastizität beim Einfrieren.³ Jährlich werden bis zu 2,7 Millionen Tonnen an Phthalaten synthetisch hergestellt.^{4,5} Im medizinischen Sektor werden sie seit dem Jahr 1955 weltweit benutzt. Innerhalb der Phthalate werden in der Regel nur die längerkettigen Phthalsäureester, die mit einem höheren Molekulargewicht in Polyvinylchlorid, eingesetzt. Die kürzerkettigen mit einem niedrigen Molekulargewicht werden für nicht kunststoffrelevante Medien, wie zum Beispiel Kosmetika und Pharmaka verwendet.⁶ Obwohl viele Phthalate produziert werden, ist das DEHP (Di-(2-ethylhexyl)phthalat) das weltweit führende in der Produktion von Polyvinylchlorid. Es macht bis zu 40% des hergestellten Polyvinylchlorids aus und hat daher einen hohen kommerziellen Nutzen.^{7 8}

2.2 DEHP (Di-(2-ethylhexyl)phthalat)

Stoffeigenschaften und Nomenklatur

Summenformel: C₂₄H₃₈O₄

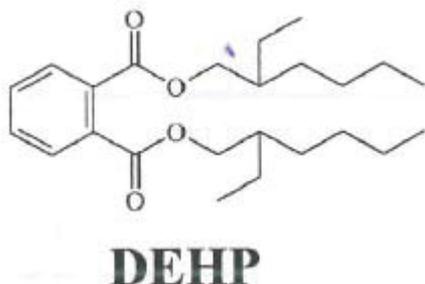


Abbildung 1: Chemische Struktur des DEHP (Di-(2-ethylhexyl)phthalat)⁹

Chemische Bezeichnung: Benzol-1,2-dicarbonsäure(2-ethylhexyl)ester

CAS- Nummer (engl. Chemical Abstracts Service): 117-81-7

Molare Masse: 390 g/ mol

Der wohl wichtigste Vertreter in der PVC Produktion ist das DEHP (Di-(2-ethylhexyl)phthalat). Im weiteren Verlauf der Abhandlung wird zur besseren Übersicht zur Beschreibung der chemischen Formel die Abkürzung DEHP benutzt. Das DEHP entsteht durch die Veresterung eines Phthalsäureanhydrids mit dem Alkohol Ethylhexanol. Dies geschieht in zwei aufeinander folgenden Reaktionsschritten. In dem ersten Reaktionsschritt entsteht ein einfacher Monoester. Unter Freisetzung von Wasser wird in einem zweiten Reaktionsschritt, der wesentlich langsamer abläuft und reversibel ist, der gebildete Monoester zum Diester. Das Wasser wird durch Destillation eliminiert. Das DEHP ist als Reinsubstanz flüssig, farblos und nahezu geruchslos. Der Schmelzpunkt ist sehr niedrig bei ungefähr -50° und der Siedepunkt recht hoch bei ungefähr 386°C .¹⁰ Es ist lipid löslich und wird von organischen Lösungsmitteln und proteinreichen Lösungen in erheblichen Umfang aus dem Kunststoff herausgelöst. In Wasser und Salzreichen Lösungen ist es dagegen relativ schlecht löslich, sodass diese Substanzen ein geringes Problem darstellen.^{11-12 13-14} Die Angabe zur Wasserlöslichkeit wird von einzelnen Autoren unterschiedlich angegeben. So liegt diese nach Cousins et al. für DEHP bei ungefähr $2,50 \mu\text{g/L}$.¹⁵ Der Dampfdruck beträgt bei 25°C ca. $1,0 \times 10^{-7} \text{ mmHg}$. Das spezifische Gewicht ist 0,986. Jährlich werden um die 2 Tonnen DEHP produziert.^{4, 16-17} Die Produktionskosten sind sehr gering.¹⁸ Die Anwendung hat ein sehr weites Spektrum. So wird es zum Beispiel in der Lebensmittelverarbeitung, in Kinderspielzeug und bereits seit Ende 1940 in der Medizin benutzt.^{2, 17} Das DEHP macht ungefähr 10-40% der PVC-Produkte in der Medizin aus. Anwendung findet es unter anderem in die Lagerung von Blutprodukten. Blutbeutel, Dialysebeuteln und Schlauchsystemen enthalten den Weichmacher. In Blutbeuteln macht das DEHP 30-40% des Gesamtgewichts aus.^{19,7} Im Bereich der Körperpflege und in Kosmetikartikeln dient es als Trägersubstanz für Deodorants, Parfüms und Cremes. Desweiteren finden sie Anwendung in der Textilindustrie u.a. als industrielle Lösemittel und als Additiv.⁸ Das DEHP begegnet uns überall im Alltag.¹¹ Eines der Gründe dafür ist, dass das DEHP, wie auch alle anderen Phthalate, in die Gruppe der äußeren Weichmacher gehören. Das bedeutet, dass sie nicht chemisch sondern physikalisch über "*Van der Waals*" Kräfte an die Kunststoffmoleküle gebunden sind und somit nach gewisser Zeit vom Kunststoff gelöst und die umliegende Umgebung abgegeben werden.^{16 9} Das

Ausmaß des Herauslösen wird durch verschiedene Faktoren verstärkt, wie zum Beispiel hohe Temperaturen und fetthaltige und proteinreiche Lösungen.^{20 14} Das DEHP besitzt eine hohe Lipophilie und eine hohe Hydrophobie.⁶ Der Prozess des Herauslösen wirkt in Erythrozytenkonzentraten positiv, da nachgewiesen worden ist, dass das DEHP die Membranen der Erythrozyten schützt, und somit die Flussgeschwindigkeit der Erythrozyten und damit verbunden die des Blutes intakt bleibt. Außerdem reduziert es die osmotische Fragilität und erhöht somit die osmotische Resistenz der Erythrozyten.²¹ Sampson berichtet, dass es zu 50% mehr Hämolyse in DEHP-freien Blutbeuteln kommt. Eine andere Studie Ende 1987 belegt, dass es einen deutlichen Unterschied in der Erythrozytenzahl in vivo gibt welche in DEHP-Beuteln versus DEHP-freien Beuteln (24h nach Transfusion von Erythrozytenkonzentraten) gelagert wurden. So lag die Erythrozytenkonzentration in vivo, welche in den DEHP-Beuteln gelagert wurden um 10% höher.^{3,2, 14} Die schützende Wirkung auf die Erythrozyten in Gegenwart des DEHP ist dem MEHP (Monoethylhexylphthalat), das ein primärer Metabolit des DEHP ist, nicht zuzuschreiben. Für den weiteren Verlauf wird für die Beschreibung des Monoethylhexylphthalat nur noch die Abkürzung MEHP verwendet. So berichten Estep et al., dass sich die Erythrozytenmorphologie im Laufe der Lagerung im Beisein des MEHP ändert. Auch kommt es zu keiner nennenswerten Reduktion der Hämolyse.²² Der DEHP-Gehalt in den Blutprodukten ist direkt proportional zur Temperatur der Blutprodukte und der Lagerungszeit.¹⁹ Durch ständige Migration von DEHP wird das Material spröde und verändert seine Oberfläche. Cole et al. konnten 1981 nachweisen, dass tiefgefrorenes Plasma deutlich weniger DEHP und MEHP beinhaltet, als unverfrorenes Plasma, was sommerlichen Temperaturen ausgesetzt war.²³ Die Diffusionseigenschaft des DEHP aus Blutbeuteln in das Blutprodukt macht man sich beim Drogenscreening bei Sportlern zu Nutze. Durch gehäufte autologe und allogene Bluttransfusionen kommt es durch den hohen Gehalt an DEHP in den Blutbeuteln und Schlauchsystemen auch zu erhöhten Nachweisen des DEHP und seiner Abbauprodukte im Urin der Sportler. Der Nachweis von autologen Bluttransfusionen wäre ansonsten sehr schwierig, da im Gegensatz zu allogenen Bluttransfusionen nicht die Möglichkeit zum Nachweis von fremden Antigenen aus dem Blutgruppensystem besteht.^{24 25}

2.2.1 Metabolismus von DEHP (Di-(2-ethylhexyl)phthalat)

Die Aufnahme von DEHP kann oral, dermal, inhalativ oder intravenös erfolgen.¹⁴ Die dermale Aufnahme stellt dabei einen sehr geringen Anteil dar.²⁶ Der Hauptanteil wird oral mit der Nahrung aufgenommen, die während der Verarbeitung und durch die Verpackung mit DEHP kontaminiert ist.⁶ Die anschließende Metabolisierung ist entsprechend dem Aufnahmeweg unterschiedlich stark ausgeprägt. Da das DEHP lipophil ist, stellt die Lipoproteinmembran der menschlichen Zellen keine unüberwindbare Barriere dar.¹⁴ Die Absorption in das Blut erfolgt nach der Hydrolyse in den korrespondierenden aktiven Metaboliten MEHP durch Lipasen und Wärme.^{27,28} Dabei wird die Hydrolyse durch die Pankreaslipase am effektivsten katalysiert, was den höheren Nachweis der Abbauprodukte bei oraler Applikation in Vergleich zur intravenösen Applikation des DEHP erklärt. Die Hydrolyse setzt bereits im Mund ein und wird durch den Speichel katalysiert.²⁶ Anschließend breitet es sich im gesamten Organismus aus, wobei die Hauptmenge auf die Leber fällt, in der auch der weitere Metabolismus stattfindet.^{10,14} Der Metabolismus von DEHP zu MEHP ist altersabhängig.²⁹ Kinder haben niedrigere Konzentrationen an Pankreaslipase, was dazu führt, dass die Metabolisierung geringer ausgeprägt ist als bei Erwachsenen.⁶ Der Metabolismus von DEHP und die daraus entstehenden Abbauprodukte werden in dem nachfolgenden Schema aufgeführt (Abbildung 2).

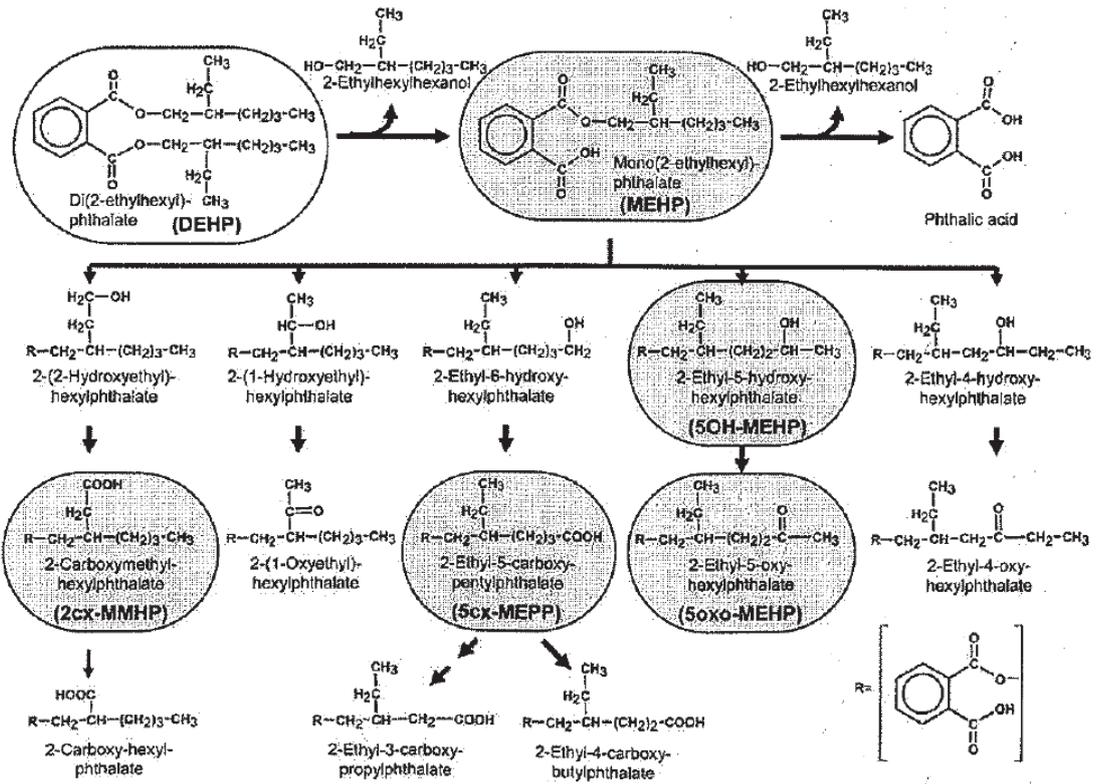


Abbildung 2: Metabolismus von DEHP

Die Metabolisierung des MEHP (Monoethylhexylphthalat) erfolgt durch Oxidation zu Mono(2-ethyl-5-oxohexyl) Phthalat und Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) Phthalat.^{31,14} Dann erfolgt die Ausscheidung der Substanzen über den Urin, die Fäces oder die Galle.^{1, 10} DEHP besitzt eine sehr geringe Polarität und kann über die Niere in nicht metabolisiertem Zustand nicht ausgeschieden werden. Nach spätestens 24 Stunden ist die gesamte Substanz aus dem Körper, ohne jegliche Akkumulation im Gewebe, verschwunden und somit nicht mehr nachweisbar.¹⁴ MEHP hat eine höhere Wasserlöslichkeit als das DEHP. Es ist aufgrund seiner freien Carboxy-Gruppe hydrophiler. Die Clearance Rate, das bedeutet die Eliminierung des MEHP aus dem Körper in den Urin, ist langsamer als die des DEHP. Diese Tatsachen erklären, warum die MEHP Konzentration, sowohl im Urin als auch im Plasma deutlich höher ist als die Konzentration an DEHP. Somit lässt sich feststellen, dass das MEHP ein Biomarker für die Exposition des DEHP ist.³² Es ist jedoch schwierig zu entscheiden, ob der gemessene Wert des MEHPs tatsächlich durch die Metabolisierung von DEHP zu MEHP oder durch abiotische Prozesse entstanden ist.⁶

2.3 Toxizität

Phthalate mit langen Alkylseitenketten, die sich in Orthostellung befinden, haben toxische Wirkung gezeigt. Zu diesen Phthalaten gehört auch das DEHP.⁶ Das DEHP, das nur ein geringes Maß an akuter Toxizität aufweist, ist in die Kategorie 2 bezogen auf fruchtschädigende und fruchtbarkeitsbeeinträchtigende Wirkung eingestuft. Es kann demnach die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen. Nach den „R- Sätzen“ (R steht repräsentativ für Risiko) werden als Gefahrenhinweise „R61“ und „R60“ vorgeschrieben. R60 besagt, dass das DEHP die Fortpflanzung beeinträchtigt und R61 besagt, dass das DEHP den Fetus schädigen kann.^{2, 33} In vielen Tierversuchen konnten bereits toxische Effekte des DEHP für zahlreiche Organsysteme nachgewiesen werden, jedoch ist die toxische Wirkung auf den menschlichen Organismus noch nicht eindeutig geklärt, und wird weiterhin im Mittelpunkt kontrovers diskutiert.^{16, 34, 35} Trotzdem rät die Europäische Union Risikogruppen, wie Neugeborenen oder Patienten mit Austauschtransfusionen, Medizinprodukte zu meiden, die Polyvinylchlorid enthalten.³⁶ Es muß ausgeschlossen werden, dass das DEHP und das MEHP mögliche kanzerogene Wirkungen auf den Menschen haben.³⁷ Bereits nachgewiesen wurde, dass das DEHP chromosomale Schäden in der Bevölkerung ausübt.⁷ Daher ist es laut eines Beschlusses der Europäischen Kommission, seit 2005 verboten, DEHP in Spielzeugen zu verwenden, welche Kinder unter drei Jahre in den Mund nehmen können.³⁸ Das DEHP wird vor allem in der Leber abgebaut und hat dort auch negative Folgen im Tierexperiment gezeigt. So führt es durch einen rezeptorvermittelten Prozess zu einer Proliferation der Peroxisomen der Leber und sogar zu Leberkrebs.¹ In der Lunge wirkt es Lungentoxisch. Desweiteren können sich Nierenschäden in Form histologischer Veränderungen der Niere und Bildung von Zysten manifestieren.³⁷ Die potenziellen Schäden des endokrinen System beschreiben Grey et al. und berichteten über strukturelle und funktionelle Beeinträchtigung der Schilddrüse durch das DEHP bei Ratten.³⁹ Eine weitere Wirkung sind Fortpflanzungs- und Entwicklungsschäden bei Nagetieren.⁴⁰ Die Testes sind das empfindlichste Zielorgan für das DEHP. Zahlreiche tierexperimentelle Studien belegen einen dosisabhängigen adversen Effekt auf den Hoden. So kann es eine Hodenatrophie, eine Abnahme der Spermien und im schlimmsten Fall einen Hodentumor verursachen. Die Sertollizellen scheinen den kritischen Wirkort für die Erzeugung der testikulären Atrophie darzustellen.^{41, 42} Bei den weiblichen Tieren werden Veränderungen der Ovarien mit einhergehenden

Verlängerungen der Zyklusdauer beschrieben.^{43,44} Da das DEHP, wie oben erwähnt, durch Hitze und enzymatische Aktivitäten schnell in seinen Metaboliten MEHP umgewandelt wird, sollte eine große Bedeutung den toxischen Effekten des MEHP gewidmet werden, da diesen auch eine höhere Toxizität nachgesagt wird.^{9, 28,45} Das MEHP aktiviert den PPAR• (engl. Peroxisome- proliferator- activated receptor •), welcher für die metabolische Toxizität des DEHP zuständig sein soll.⁴⁶ Im Herzen wirkt es kardiotoxisch.³⁷ Es verursacht im Tierexperiment noch neben den bereits aufgezählten Nebenwirkungen chromosomale Schäden und toxische Schäden in den Sertolli Zellen.^{1,7} Durch die gute Plazentagängigkeit kann es zu teratogenen und embryo-fetotoxischen Schäden kommen.⁶

2.4 Exposition und Risikogruppen

Das DEHP gehört zu den Umweltchemikalien, denen die Bevölkerung weltweit alltäglich ausgesetzt ist. Durch das ubiquitäre Vorkommen unter anderem in Spielzeugen, Pharmaka, Lebensmittelverpackungen und Kosmetika kommt man täglich mit der chemischen Verbindung in Kontakt.³² Die durchschnittliche Aufnahme von DEHP beträgt schätzungsweise 1 mg/kg/Tag für europäische Erwachsene und 2 mg/kg/Tag für europäische Kinder.¹⁷ Auf der Grundlage von zahlreichen Tierversuchen wurden die NOAELs (engl. No Observed Adverse Effect Levels) abgeleitet. Diese Werte geben die höchste Menge einer Substanz an, die tolerabel bzw. akzeptabel ist, keine schädigende Wirkung aufweist und ohne jegliches Risiko verbunden ist. Anschließend werden aus diesen Untersuchungen die TDI (engl. tolerable daily intake) Werte abgeleitet. Der TDI Wert gibt jene Menge einer Substanz an, welche täglich, ein Leben lang aufgenommen werden kann, ohne das es zu Gesundheitsschäden kommt. Zum Teil werden diese Werte jedoch deutlich überschritten und der TDI (eng.tolerable daily intake), der bei 20-48 µg/kg Körpergewicht/ Tag liegt vernachlässigt. Da die TDI Werte Vorsorgewerte darstellen, bedeutet eine kurzfristige Überschreitung keine unmittelbare Gefährdung der Gesundheit. Der NOAEL für DEHP beträgt 4,8 mg/kg/Tag.^{5, 47,2, 8} Als LD₅₀ (letale Dosis für 50% der getesteten Tiere) werden für das DEHP in Abhängigkeit vom Aufnahmeweg zwischen 14-50 g/kg Körpergewicht.^{2,48} Selbst in der Atemluft, im Hausstaub und im Trinkwasser kommt DEHP vor. Da das DEHP aber nahezu wasserunlöslich ist und einen sehr niedrigen Siedepunkt aufweist, sind diese

Konzentrationen äußerst gering. Kinder haben ein höheres Atemminutenvolumen als Erwachsene und sind somit einer höheren Exposition durch DEHP ausgesetzt. Der Hauptweg, wie die Bevölkerung mit DEHP in Berührung kommt, ist eine indirekte Exposition durch DEHP kontaminierte Lebensmittel.^{6, 26, 49} Täglich werden bis zu 10 µg/kg KG/Tag an DEHP über die Nahrung aufgenommen.³⁸ Kinder nehmen mehr Kalorien/kg KG (Körpergewicht) täglich zu sich und damit verbunden höhere Mengen an DEHP.⁶ In der Medizin führen bestimmte Therapien in besonderem Maße zu erhöhten DEHP-Expositionen. Dazu gehört die Transfusion mit Blutprodukten, wie zum Beispiel Erythrozytenkonzentraten, Plasmen, Thrombozytenkonzentraten und Vollblutkonserven.³⁴ Die Hydrolyse von DEHP zu MEHP (Monoethylhexylphthalat) ist in Plasmen und Thrombozytenkonzentraten höher als in Erythrozytenkonzentraten und Vollblutkonserven.⁵⁰ Eine weitere Expositionsquelle mit DEHP und MEHP sind die parenterale und enterale Ernährungstherapie. Hier beträgt die DEHP Exposition beim Menschen bis zu 10-20 mg/kg KG/Tag.⁵¹ Auch durch die Therapie mit extrakorporalen Kreisläufen, wie die Hämo- und Peritonealdialyse und verschiedene Aphereseverfahren sind Patienten/innen hohen Expositionen an DEHP und MEHP ausgesetzt.⁴⁹⁻⁵⁰ Dabei werden Werte an DEHP von bis zu 150 mg in fünf Stunden ermittelt.⁵² Wahl et al berichten von Werten zwischen 9- 360 mg/ Patient/ Hämodialyse.⁵³ Die Gruppe der Spender ist ebenfalls erhöhten Werten an DEHP und MEHP ausgesetzt. So sind besonders bei Trombozytenspendern im Vergleich zu anderen Spendern, erhöhte Werte an DEHP nachweisbar. Dies liegt darin begründet, dass bei der Thrombozytenapherese ein größeres Blutvolumen über eine längere Zeit die Apheresemaschine und damit verbunden die Plastik-Schläuche passiert. Bei Trombozytenspendern, die sich in regelmäßigen Zeitabständen einer Apherese unterziehen sind Mengen an DEHP von 32,2 µg/kg KG/Tag nachgewiesen und bei Spendern, die gelegentlich spenden, Werte von 18,1 µg /kg KG /Tag.^{2,8} Früh- und Neugeborene sind besonders hohen DEHP-Expositionen ausgesetzt, da diese die Plazenta passieren kann und in der Muttermilch ebenfalls enthalten ist.²⁶ Da der Stoffwechsel von Früh- und Neugeborenen nicht vollständig ausgereift ist, findet nur eine unzureichende Glukuronidierung statt. Dies führt dazu, dass das DEHP langsamer abgebaut wird und somit länger im Körper verweilt. Auch die noch verminderte renale Clearance bei Neugeborenen führt zu erhöhten Substanzspiegeln.^{6, 54} Diese können bei transfundierten Neugeborenen Werte von bis zu 10-20 mg/kg KG/Tag annehmen.⁵¹ Posnack et al. berichten, dass intensivpflichtige Neugeborene im Vergleich zu gesunden einen 26-fach höheren DEHP

Wert aufweisen.¹³ Durch Hydrolyse entsteht aus den erhöhten DEHP Werten, eine erhöhte MEHP Konzentration, die wie bereits erwähnt, bekanntlich für einen großen Teil der toxischen Wirkung des DEHP verantwortlich ist.¹⁴

2.5 Alternativen zum DEHP für Blutprodukte (Di-(2-ethylhexyl)-phthalat)

Bereits seit längerem beschäftigt sich eine Vielzahl von Studien mit der Frage nach eventuellen Alternativen zum DEHP. Hildebrand berichtet, wie auch zahlreiche Autoren vor ihm, dass eine Beschichtung von Medizinprodukten mit Heparin das Herauslösen von DEHP (Di-(2-ethylhexyl)phthalat) verringert, aber nicht komplett verhindert. Auch nach Gebrauch von beschichteten Materialien sind sowohl das DEHP als auch das MEHP in geringeren Mengen im Serum nachweisbar.³ Eine weitere Alternative ist das TEHTM (Tri(2-Ethylhexyl)trimellitat), das 1981 auf dem Markt erschien. Es ist aufwendiger dieses aus der Matrix zu entfernen, als das DEHP, da es einen höheren Siedepunkt und ein höheres Molekulargewicht aufweist. Folglich migriert es weniger in die umliegende Substanz. In Blutprodukten ist es verglichen mit dem DEHP in weniger als 0,01% nachweisbar.^{22 14 21, 55} In kühl gelagerten Blutprodukten ist es sogar nach 42 Tagen unter der Nachweisgrenze.²¹ Der Nachteil ist, dass es als Weichmacher weniger effizient ist und eine größere Menge davon benötigt werden, um die gleiche Effektivität wie das DEHP zu erreichen.²² Es weist eine ausgezeichnete Gasdurchlässigkeit sowohl für das O₂ (Sauerstoff), als auch das CO₂ (Kohlenmonoxid) bei der Verwendung von Blutbeuteln auf. Daher wird es bevorzugt für die Beutel der Thrombozytenkonzentrate verwendet, da diese äußerst sensitiv auf eine Veränderung des pH-Werts in ihrem Milieu reagieren und ein intakter Gasaustausch obligat sein muss. So sind in Thrombozytenkonzentraten, die 7 Tage bei Raumtemperatur gelagert wurden, TEHTM Werte in Höhe von 0,2 mg/ Beutel nachgewiesen worden.^{21,14, 56} Auch Sampson berichtete, dass für Thrombozytenkonzentrate das TEHTM oder alternativ das BTHC (butyryl-trihexyl-citrate) verwendet werden können. Wobei für die Verwendung von BTHC-Beuteln die Thrombozytenlagerungszeit nur 5 Tage betrifft.^{19 2} Das BTHC wurde speziell für die Erythrozytenkonzentrate hergestellt. Sowohl das BTHC selbst, wie auch seine Abbauprodukte, zeichnen sich durch fehlende Toxizität aus. Es besitzt ähnliche technische Eigenschaften wie das DEHP. Allerdings reduziert es, im Vergleich

zum DEHP, die Lyse der Erythrozyten schwächer. Auch das ATBC (acetyl-tri-n-butyl-citrate) stellt eine mögliche Alternative dar. Es besitzt nahezu identische Eigenschaften wie das BTHC, wird jedoch bevorzugt in den USA verwendet. Schließlich sei noch das DINCH (Diisononyl-ester of cyclohexanedicarboxylic acid) erwähnt. Es ist charakteristisch sehr ähnlich wie das DEHP. Sein Vorteil ist, dass es nicht in hohem Maße in das umliegende Gewebe migriert und Erythrozytenkonzentrate in DINCH- Beuteln gut gelagert werden können. Das DEHA (diethylhexyladipate) ist von untergeordneter Bedeutung. Es besitzt keine nennenswerte geringere Toxizität, als das DEHP und ist, verglichen mit dem DEHP, flüchtiger und gelangt somit schneller in das umliegende Gewebe. Es besitzt bessere Eigenschaften im Bereich tiefer Temperaturen. Für die Lagerung von Erythrozytenkonzentraten ist es nicht geeignet.¹⁴ Die nachfolgende Abbildung 3 veranschaulicht die oben erwähnten Alternativen zu DEHP mit ihren chemischen Strukturen.

| Name Plasticizer | Acronym | Formula | R |
|---|-----------------|---------|--|
| di-(2-ethylhexyl)-phthalate | DEHP (DOP) | | R = |
| tri-(2-ethylhexyl)-trimellitate (trioctyltrimellitate) | TEHTM (TOTM) | | R = |
| butyryl-tri-n-hexyl-citrate | BTHC | | R ₁ = R ₂ = |
| acetyl-tri-n-butyl-citrate | ATBC | | R = |
| di-isononyl-1,2-cyclohexane-di-carboxylate (hexamoll) | DINCH | | R ₁ and R ₂ = C ₉ H ₁₉ (10 % n-nonyl, 35-40 % methyloctyl, 40-45 % dimethylheptyl, 5-10 % methylethylhexyl) ranging from C ₈ H ₁₇ to C ₁₀ H ₂₁ |
| di-(2-ethylhexyl)-adipate | DEHA | | R = |

Abbildung 3: Chemische Strukturen und Summenformeln einiger Phthalate, die als Alternative zu DEHP benutzt werden können. ¹⁴

2.6 Spendertypen von Hämatopoetischen Stammzellen

Bezüglich der Herkunft der Stammzellen des Empfängers unterscheidet man zwischen allogenen und autologen Spendertypen. Allogene Stammzellen stammen aus dem Blut oder dem Knochenmark eines gesunden Spenders. Als eine sehr wichtige Voraussetzung für die allogene Transplantation ist die HLA-Kompatibilität zwischen

Spender und Empfänger. Autologe Stammzellen werden dem Patienten selbst im Verlauf einer früheren Therapie entnommen, kryokonserviert und schließlich wieder retransfundiert. Hierbei besteht nahezu keine Abstoßungsreaktion. Die Stammzellen werden aufgereinigt und bearbeitet, sodass noch vorhandene maligne Zellen eliminiert werden.⁵⁷

2.7 Hämatopoetische Stammzellen

Die kontinuierliche Bildung von Blutzellen wird als Hämatopoese bezeichnet. Diese findet im Allgemeinen im Knochenmark statt. Die Voraussetzung für eine intakte Hämatopoese ist das Vorhandensein von hämatopoetischen Stammzellen. Physiologisch kommen die hämatopoetischen Stammzellen vor allem im Knochenmark vor. Sie können aber auch vereinzelt im peripheren Blut vorkommen.⁵⁸ Stammzellen sind die Ursprungszellen aller Organe und Gewebe des menschlichen Organismus. Sie haben die Fähigkeit sich selbst zu erneuern und in andere spezialisierte Zellen zu differenzieren.⁵⁹ Dies geschieht durch eine asynchrone Teilung, bei der die eine Tochterzelle als Stammzelle verbleibt, was zur Aufrechterhaltung des Stammzellpools im Knochenmark führt. Die andere Zelle hingegen ist eine Vorläuferzelle, welche Differenzierungspotential besitzt, womit sie spezialisierte Aufgaben in unterschiedlichen Geweben übernehmen kann.⁶⁰ Durch diese Fähigkeiten der Selbsterneuerung und der Differenzierung können die hämatopoetischen Stammzellen lebenslang die enorme Zahl an Zellen bilden.⁶¹ Dies sind ungefähr $3,5 \times 10^{11}$ Blutzellen pro Tag. Die folgende Abbildung zeigt eine Stammzelle und den Anfang ihrer Differenzierung.

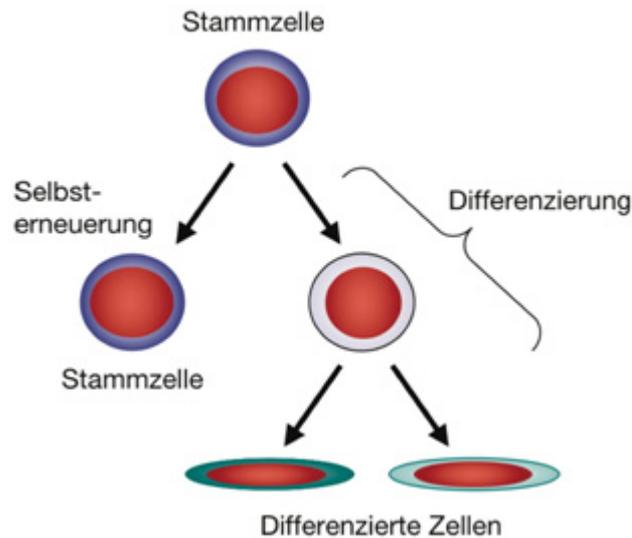


Abb. 4: Differenzierung einer Stammzelle.

2.8 CD34+ Antigen

Das bereits 1984 von Civin et al. entdeckte CD34 Antigen (CD= cluster of differentiation) ist ein immunhistochemischer Marker, der von Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen, Fibroblasten und Endothelzellen gebildet wird.^{62 63} Die CD34 Expression wird bei der Reifung der hämatopoetischen Stammzellen herunter reguliert. Daraus folgt, dass die primitiven hämatopoetischen Stammzellen mehr CD34 Antigen besitzen, als die multipotenten Vorläuferzellen.⁶⁴ Daher eignet sich das CD34 Antigen, um eine Apherese hinsichtlich Ihres Erfolges zu quantifizieren. Durch eine Messung im Durchflusszytometer mittels Antikörpermarkierung lässt sich die Menge der gesammelten Stammzellen ermitteln.

2.9 Zielsetzung

Phthalate kommen in unserer Umwelt ubiquitär vor. Die bekannten toxischen Eigenschaften für den Menschen werden dabei widersprüchlich kommuniziert. Phthalate sind auch gehäuft in medizinischen Bereichen nachgewiesen worden. So auch in Therapien mit extrakorporalen Kreisläufen. Aufgrund der beschriebenen Exposition, wurde für diese Studie als Untersuchungskollektiv die Gruppen der peripheren autologen und allogenen Stammzell-Spender/innen, sowie zum Vergleich die Gruppe der Knochenmarkspender/innen gewählt. Ziel der vorliegenden Studie war es zunächst herauszufinden, ob die Lagerungszeit, die Lagerungstemperatur und verschiedene organische und nicht organische Substanzen das Migrationsverhalten der Phthalate aus PVC-haltigen Artikeln beeinflussen. Da DEHP das wohl wichtigste und am meisten verwendete Phthalat ist und das MEHP als primäres Abbauprodukt mit einer sehr hohen toxischen Eigenschaft, sollte sich die Detektion ausschließlich auf diese beiden Vertreter beschränken. Die Detektion erfolgte durch eine gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse. Abschließend sollte untersucht werden, ob die nachgewiesene migrierte Menge an DEHP und MEHP eine Gesundheitsgefährdung für das Untersuchungskollektiv darstellt.

Folgende Fragen sollen aufgrund dessen anhand dieser Studie beantwortet werden:

1. *Inwiefern unterscheiden sich die Blutbilder aus dem peripheren Blut zwischen den allogenen- und autologen Stammzell-Spendern?*
 2. *Sind die Weichmacher DEHP und MEHP im peripheren Blut von autologen und allogenen Stammzellspendern/innen und in der Knochenmarkspende nachweisbar?*
 3. *Sind die oben genannten Weichmacher auch im Apheresat der autologen Spender/innen vorhanden? und hat die Lagerungszeit sowie die Lagerungstemperatur Einfluss auf den Gehalt an DEHP und MEHP?*
- 3.1 *Sind die Weichmacher MEHP und DEHP im allogenen Apheresat nachweisbar?*
 - 3.2 *Gibt es zwischen dem allogenen und dem autologen Apheresat einen signifikanten Unterschied im Gehalt der Phthalate*

4. *Sind die Phthalate MEHP und DEHP im Knochenmark allogener Knochenmarkspender vorhanden und welchen Einfluss hat die Dauer der Lagerung auf den Gehalt an MEHP und DEHP?*
- 4.1 *Gibt es einen statistischen Unterschied zwischen dem Gehalt an DEHP und MEHP in den Knochenmarkpräparaten und den allogenen Stammzellapheresaten*
5. *Gibt es Unterschiede zwischen dem reinen Plasma, dem Gemisch aus Plasma und Apheresat und dem reinen Apheresat in Bezug auf den DEHP und MEHP Gehalt?*
- 5.1 *Wie ist das Verhältnis von DEHP zu MEHP während einer Lagerung über 72 Stunden in reinem Apheresat, in reinem Plasma und im Gemisch aus Plasma und Apheresat (3:1)?*
6. *Welchen Einfluss hat die Lagerungstemperatur auf den Gehalt an DEHP und MEHP im Plasma allogener Stammzellspender?*
7. *Sind die Phthalate DEHP und MEHP in einer Natriumchloridlösung 0,9% nachweisbar, welche bei -80°C, 4°C und 37°C gelagert wurde?*
8. *Diffundieren DEHP und MEHP während des Apheresevorgangs aus dem Einmalschlauchsystem?*

3. Material und Methode

3.1 Spenderkollektiv

Im Rahmen dieser Studie wurden die Daten von 51 Personen erfasst, die im Zeitraum von Februar 2011 bis Dezember 2012 im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) des Universitätsklinikums Düsseldorf vorstellig wurden. Das Spenderkollektiv setzte sich zusammen aus 20 autologen peripheren Stammzellspender/innen, 21 allogenen peripheren Stammzellspendern/innen und 10 Knochenmarkspendern/innen. Die Feststellung, ob Personen für eine Stammzell- bzw. Knochenmarkentnahme geeignet waren, erfolgte nach einer ausführlichen Anamnese und einer körperlichen und laborchemischen Untersuchung. (Aktenzeichen der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität im Rahmen der ethischen und rechtlichen Beratung: 3623).

Das Spenderkollektiv für diese wissenschaftliche Arbeit wurde zufällig auserwählt. Dabei war die einzige Bedingung, dass die Spendevoraussetzungen entsprechend den Transfusionsmedizinischen Richtlinien erfüllt wurden.

Die Spender/innen wurden in der Ergebnisbetrachtung in drei Gruppen eingeteilt.

3.1.1 Allogene Spender/innen

Von den insgesamt 51 Spendern/innen gehörten 31 zur Gruppe der allogenen Spender. Diese setzten sich aus 21 allogenen peripheren Stammzellspendern/innen und 10 Knochenmarkspendern/innen zusammen.

Allogene periphere Stammzellspender/innen

Zunächst wurden von den allogenen peripheren Stammzellspendern/innen die Anamnesangaben das Geschlecht, das Alter (Jahre), das Gewicht (kg) und die Größe (cm) im Durchschnitt aufgeführt. Zusätzlich wurden die Parameter Blutvolumen (ml), Leukozytenzahl/ μl , Erythrozytenzahl ($\text{M}/\mu\text{l}$), Thrombozytenzahl/ μl , Hämoglobin (g/dl), Creatinin im Serum (mg/dl) und die Glomeruläre Filtrationsrate (ml/min) im Durchschnitt erfasst. Tabelle 1 gibt die Zusammenfassung der Parameter wider

Tabelle 1: Durchschnitt des: Alters, Gewichts (kg), Größe (cm), Blutvolumens (ml), Leukozytenzahl/ μ l, Erythrozytenzahl (M/ μ l), Hämoglobins (g/dl), Thrombozytenzahl/ μ l, Creatinins im Serum (mg/dl) und der glomerulären Filtrationsrate (ml/min) des Spenderkollektivs der allogenen peripheren Stammzellspender/innen getrennt in männlich und weiblich

| | männlich | weiblich |
|--|----------|----------|
| Geschlecht | 14 | 7 |
| Durchschnittsalter (Jahren) | 40 | 44 |
| Durchschnittsgewicht (kg) | 95 | 70 |
| Durchschnittsgröße (cm) | 184 | 164 |
| Durchschnittsblutvolumen (ml) | 5658 | 4199 |
| Durchschnitts-Leukozytenzahl/ μ l | 46735 | 43500 |
| Durchschnitts-Erythrozytenzahl (M/ μ l) | 5 | 4 |
| Durchschnitts- Hämoglobin (g/dl) | 13,8 | 13,6 |
| Durchschnitts- Thrombozytenzahl/ μ l | 242000 | 255000 |
| Durchschnitts-Creatinin im Serum (mg/dl) | 1 | 0,9 |
| Durchschnitts- Glomeruläre Filtrationsrate(ml/min) | 76 | 85 |

Knochenmark-Spender/innen

Der Gruppe der allogenen peripheren Stammzellspendern/Spenderinnen wurde die Gruppe der allogenen Knochenmarkspender/innen gegenübergestellt. Auch in dieser Gruppe wurden die Daten aus der Anamnese, Geschlecht, Alter (Jahre), Gewicht (kg), Größe (cm) im Durchschnitt erfasst. Desweiteren wurden auch für diese Gruppe die Leukozytenzahl/ μ l, Erythrozytenzahl (M/ μ l), Thrombozytenzahl/ μ l, Hämoglobin (g/dl), Creatinin im Serum (mg/dl) und die Glomeruläre Filtrationsrate (ml/min) im Durchschnitt erfasst. Tabelle 2 gibt die Zusammenfassung der Parameter wider

Tabelle 2: Zusammensetzung des Kollektivs, der Knochenmarkspender/innen

| | männlich | weiblich |
|--|----------|----------|
| Geschlecht | 7 | 3 |
| Durchschnittsalter (Jahren) | 38 | 27 |
| Durchschnittsgewicht (kg) | 87 | 63 |
| Durchschnittsgröße (cm) | 178 | 162 |
| Durchschnitts-Leukozytenzahl/ μ l | 6400 | 8533 |
| Durchschnitts-Erythrozytenzahl (M/ μ l) | 5,2 | 4,6 |
| Durchschnitts- Hämoglobin (g/dl) | 15,3 | 12,4 |
| Durchschnitts- Thrombozytenzahl/ μ l | 234571 | 241000 |
| Durchschnitts-Creatinin im Serum (mg/dl) | 0,9 | 0,8 |
| Durchschnitts- Glomeruläre Filtrationsrate(ml/min) | 78 | 105 |

3.1.2 Autologe Stammzellapherese- Spender/innen

Die Gruppe der autologen Stammzellspender/innen wurde der allogenen Spendergruppe gegenübergestellt und mit ihr verglichen. In dieser Gruppe wurden die gleichen Spenderdaten erhoben, wie in der allogenen Spendergruppe: aus der Anamnese wurden das Geschlecht, das Alter (Jahre), das Gewicht (kg) und die Größe (cm) eruiert. Zudem wurden die Parameter Blutvolumen (ml), Leukozytenzahl/ μ l, Erythrozytenzahl (M/ μ l), Thrombozytenzahl/ μ l, Hämoglobin (g/dl), Creatinin im Serum (mg/dl) und die glomeruläre Filtrationsrate (ml/min) ermittelt. Tabelle 3 gibt die Zusammenfassung der Parameter wider

Tabelle 3: Zusammensetzung des Spenderkollektivs der autologen Stammzellapherese

| | männlich | weiblich |
|--|----------|----------|
| Geschlecht | 14 | 6 |
| Durchschnittsalter (Jahren) | 47 | 61 |
| Durchschnittsgewicht (kg) | 84 | 72 |
| Durchschnittsgröße (cm) | 180 | 163 |
| Durchschnitts-Blutvolumen (ml) | 5403 | 4087 |
| Durchschnitts-Leukozytenzahl/ μ l | 25926 | 18767 |
| Durchschnitts-Erythrozytenzahl (M/ μ l) | 3,4 | 3,3 |
| Durchschnitts- Hämoglobin (g/dl) | 9,9 | 11 |
| Durchschnitts- Thrombozytenzahl/ μ l | 124000 | 153000 |
| Durchschnitts-Creatinin im Serum (mg/dl) | 1 | 0,7 |
| Durchschnitts- Glomeruläre Filtrationsrate(ml/min) | 87 | 98 |

3.2 Grundlagen

Vor der detaillierten Beschreibung der Durchführung der Versuche wird der Vorgang der Apherese und der Durchflusszytometrie als Grundlage dargestellt. Diese beiden Verfahren dienen der Probengewinnung, die für diese wissenschaftliche Arbeit maßgebend waren.

3.2.1 Durchführung der Stammzellapherese

Die Apherese ermöglicht es, einzelne Blutkomponenten anzureichern und zu gewinnen, ohne den Patienten unnötig mit hohen Blutverlusten zu belasten. Dies erfolgt nach dem Prinzip der Durchflusszentrifugation unter Zuhilfenahme eines Zellseparators

Dabei wird die unterschiedliche Größe, Sedimentationseigenschaft und die Dichte der einzelnen Zelle ausgenutzt. Die Apherese findet statt, nachdem die Stammzellen in den peripheren Blutkreislauf aus dem Knochenmark mobilisiert wurden. Zur Verfügung stehen Geräte verschiedener Hersteller. In unserer Untersuchung kam das Cobe Spectra Apheresesystem (Cobe Spectra I, II, III oder IV, Software Version 4.7 oder 6.1 PBSC (Fa. GambroBCT) mit dem Aphereseset: CobeSpectra Closed Blood Cell Set, FC „WBC“ ISBT (Fa. GambroBCT) zum Einsatz. Erforderlich ist ein peripherer Zugang. Sollten die Venenverhältnisse nicht gut sein, so ist die Anlage eines zentralvenösen

Katethers notwendig. Über den Zugangsschlauch wird das Blut dem Spender/ der Spenderin entnommen, antikoaguliert und in die Maschine geleitet. Als Antikoagulantien werden ACD-A und Heparin verwendet. Zu Beginn der Apherese werden 5 ml ACD-A und 5000 IE Heparin (Unfraktioniertes Heparin, Heparin-Natrium- 5000- ratiopharm (Fa. Ratiopharm)) in den Sammelbeutel über das dafür vorgesehene Schlauchsystem überführt. In der Maschine wird das Blut in Schichten in seine Bestandteile aufgetrennt. Nach Passage durch das Apheresesystem wird das Blut mit den nicht gesammelten Bestandteilen über die kontralaterale Armvene wieder retransfundiert. Zur Errechnung des Gesamtblutvolumens werden Größe, Geschlecht, Gewicht und der aktuelle Hämatokrit einbezogen. Eine Zwischenmessung wird stets durchgeführt, um eine Aussage über die Dauer der Apherese bis zum Erreichen der gewünschten Zellkonzentration machen zu können. Unter sterilen Bedingungen wird, im Rahmen der Aufbereitung des Stammzellprodukts, jedem Sammelbeutel nach der Apherese ein Aliquot entnommen. Dieses dient für weitere Laboranalysen.

Die Abbildung 1 zeigt das Spectra Optia-System mit seinen einzelnen Komponenten. Diese sind in der Abbildung 2 tabellarisch aufgeführt und funktionell beschrieben.

Komponenten des Spectra Optia-Systems



Abbildung 1: Spectra Optia- Apheresesystem Vorder- und Rückseite (Bedienungsanleitung spectra Optia Apheresis system, CaridianBCT, 09/2008, Artikel-Nr. 777377-094, Seite 18)

| | Komponente | Funktion |
|----|---|---|
| 1 | Sensorbildschirm | Ermöglicht die Kommunikation mit dem System. |
| 2 | Beutelaufhängung | Mit Haken zum Aufhängen von Beuteln und Behältern. Kann für den Transport abgesenkt werden. |
| 3 | Netzschalter | Zum Ein- und Ausschalten der Stromzufuhr zum Gerät. |
| 4 | Frontplatte | Enthält die Pumpen, Ventile, Sensoren und Detektoren. |
| 5 | Kassettenhalterung | Hält die Schlauchset-Kassette in Position. |
| 6 | Seal Safe-System | Versiegelt die Schläuche des Schlauchsets. |
| 7 | Sichtfenster | Ermöglicht die Sicht durch die Zentrifugentür, damit der Bediener die Schnittstelle im Kanal sehen kann. |
| 8 | Zentrifugentür | Gewährt Zugang zur Zentrifugenkammer. |
| 9 | Rollen | Zum Transportieren des Gerätes. |
| 10 | Rollenpedal | Zum Ausrichten der Rollen in die gewünschte Transportrichtung bzw. zum Arretieren der Rollen, damit das Gerät nicht wegrollt. |
| 11 | Rollen am Griff | Erleichtern den Transport des Gerätes in einer horizontalen Position. |
| 12 | Seriennummer des Gerätes | Einzigartige Nummer, die das Gerät identifiziert. |
| 13 | Entriegelungstaste der Beutelaufhängung | Ermöglicht das Absenken der Beutelaufhängung. |
| 14 | Netzkabel | Verbindet das Gerät mit einer Stromquelle. |
| 15 | Netzkabelhalterung | Sichert das Netzkabel während des Transports. |
| 16 | Ethernet-Anschluss | Ermöglicht den Anschluss des Gerätes an einen Drucker oder Computer, damit ein Verfahrensbericht gedruckt werden kann. |
| 17 | Zubehörhalterung (nicht abgebildet) | Zur Befestigung eines zusätzlichen Gerätes während eines Aphereseverfahrens, z. B. eines Blutwärmers oder einer Infusionspumpe. |

Abbildung 2: Komponenten des Spectra Optia-Systems und deren Funktion (Bedienungsanleitung spectra Optia Apherese system , CaridianBCT 09/2008, Artikel-Nr. 777377-094, Seite 19)

Systembeschreibung

Das CobeSpectra Apheresegerät besteht aus dem Apherese-system, durch das der extrakorporale Kreislauf während der Apherese beobachtet und kontrolliert wird, und dem Einwegset, was in der Abbildung 3 bildlich dargestellt ist. Das Einwegset setzt sich zusammen aus einem Schlauchsystem und Trennkammern. Die Schläuche sind für das zirkulierende Blut und die verwendeten Lösungen, die ACD-A-Lösung, (500ml (Fa. Haemonetics) und die NaCl-Lösung (Natriumchloridlösung 0,9% 1000ml (Fa. Baxter)) vorgesehen. Die Trennkammer befindet sich in der Zentrifuge und dient durch das

Drehen zur Auftrennung des Blutes in seine einzelnen Bestandteile. Aufgrund der kleinen Dichte, befindet sich das Plasma am Innersten der Kammer. Nach außen hin ordnen sich mit steigender Dichte, die restlichen Blutbestandteile. So befinden sich die Erythrozyten, mit der höchsten Dichte der Zellfraktion, am äußersten. Durch einen Einlassschlauch tritt das antikoagulierte Vollblut in die Einlasskammer. Dort erfolgt durch Zentrifugation die Auftrennung in Erythrozyten, Leukozyten und Plasma, welches thrombozytenreich ist. Dabei sind die Sammelkammer und die Einlasskammer räumlich voneinander getrennt. Von der Einlasskammer gehen vier Schläuche zu den einzelnen Kanälen ab. Zwischen der Erythrozyten- Schicht und der Plasma- Schicht befinden sich die Sammel- und Schnittstellen-Kontrollschläuche. Diese Schicht ist manuell einstellbar und jeder Zeit veränderbar. Sie ist abhängig von der Flussrate des Plasmas und der Erythrozyten. In ihr liegen die zu sammelnden Leukozyten. Die Erythrozyten und das Plasma werden direkt aus den Schläuchen, die in die jeweilige Schicht führen, entnommen. Die gewünschten Bestandteile werden in einem Sammelbeutel aufgefangen. In einem separaten Beutel wird das thrombozytenreiche Plasma gesammelt. Ist die zu sammelnde Menge an Stammzellen erreicht, werden dem Spender die Erythrozyten und der größte Teil des plättchenreichen Plasmas wieder zurückgeführt und die Schläuche mit NaCl (Natriumchloridlösung 0, 9% 1000ml (Fa. Baxter)) gespült.

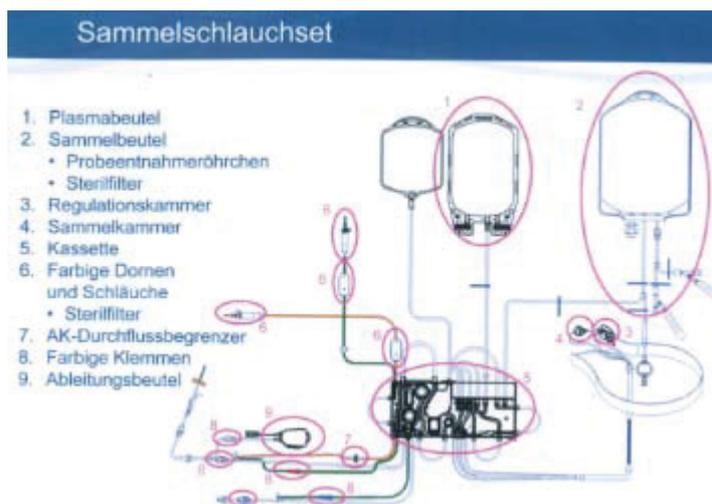


Abbildung 3: Sammelschlauchset des Spectra Optia-Apheresesystems, zur Sammlung von mononukleären Zellen (Verfahren zur Sammlung mononukleärer Zellen (MNZ), Spectra Optia Apheresesystem, MNZ-Sammlung- 306610111, Seite 5)

3.2.2 Durchflusszytometrische Zellanalyse

Prinzip

Die Durchflusszytometrische Zellanalyse erfolgt am Durchflusszytometer Beckman Coulter Epics XL MCL mit Hilfe einer Software (EXPO 32/ RXP). Das Prinzip dieses computerunterstützten Verfahrens basiert auf der unterschiedlichen Fluoreszenz- und Streulichteigenschaft einzelner in einer Flüssigkeit fokussierter Partikel, während der Passage eines Laserstrahls spezifischer Wellenlänge. In unserem Fall kommt ein Argon- Ionen Laser (488 nm) zum Einsatz.

Die Zellen werden mit bestimmten Antikörpern, meistens werden monoklonale Antikörper verwendet, die an Fluoreszenz- Farbstoffe konjugiert sind markiert. Es werden unterschiedliche Farbstoffe verwendet. Mit Hilfe der Antikörper lassen sich spezielle Antigene detektieren, die sowohl intra- als auch extrazellulär liegen können. Durch hydrodynamische Fokussierung mittels Hüllstromflüssigkeit wird ein Probenstrom erzeugt. Dadurch werden die Zellen in einer Flüssigkeit einzeln, durch eine dünne Kapillare geleitet und vom Laser idealerweise am definierten Messpunkt erfasst. So werden die Farbstoffe zur Emission von Licht mit bestimmter Wellenlänge angeregt. Dieses wird von speziellen Detektoren erfasst, nachdem es durch einen Photomultiplier verstärkt worden ist. Anschließend erfolgt die Auswertung der digitalisierten gemessenen Werte mit der Computersoftware EXPO 32. Die Intensität der Fluoreszenz ist ein Maß für die Menge des Antigens des zu untersuchenden Proteins. Der Beckman Coulter EPICS XL ist in der Lage vier Antigene auf einer Zelle zu erfassen. Die Verarbeitung der Messsignale erfolgt computergesteuert mit Hilfe des Programms EXPO 32/RXP. Noch während der Messung erfolgt die statistische Auswertung.

3.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie- Massenspektrometrie (LC MS)

3.3.1 Allgemeines

Mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie- Massenspektrometrie (LCMS) wurden die Phthalate DEHP und MEHP aus Plasma und Apheresat , welches von

allogenen und autologen Spendern/innen gewonnen wurde, aus Knochenmarkpräparaten allogener Knochenmarkspender/innen und aus 0,9% tiger Natriumchloridlösung identifiziert. Diese Identifizierung war das Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit.

3.3.2 Material und Methoden

3.3.2.1 Probenvorbereitung

Zur qualitativen und quantitativen Vermessung des Probenmaterials mittels HPLC-MS/MS (*High Performance Liquid Chromatography - Tandem Massspectrometry*) wurden 50- μ l-Aliquote mit 5 μ l internen Standards mit einer Konzentration von 50ng/ml versetzt und eine Proteinfällung mit Hilfe von Acetonitril (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) im 2,5-fachen Überschuss durchgeführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 17.000 G (Heraeus Pico17 Centrifuge, Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) wurde der Überstand in Glasvials überführt und anschließend vermessen.

Die Quantifizierung erfolgte über Kalibriergeraden mit mindestens sechs Kalibrierpunkten die in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 100 μ g/ml lagen. Dazu wurden Lösungen der Referenzmaterialien DEHP und MEHP (Camebridge Isotope Laboratories Inc., Andover, MA, USA) mit deionisiertem Wasser (Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne, France) verdünnt.

Als interne Standards, die zur Überprüfung der Chromatographie und Korrektur der Analytensignale dienten, wurden stabil isopenmarkierte Analoga verwendet: D₄-DEHP und ¹³C₄-MEHP (Camebridge Isotope Laboratories Inc., Andover, MA, USA).

3.3.2.2. Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie- Tandem Massenspektrometrie

Für die Chromatographie wurde ein Agilent Hochleistungs-Flüssigkeitschromatograph der 1100er-Serie genutzt (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Dieser war über eine HESI-Quelle (*Heated Electrospray Ionization*) mit einem 4000-Q-Trap

Massenspektrometer (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verbunden. Das 400-Q Massenspektrometer ist in der Abbildung 4 dargestellt.

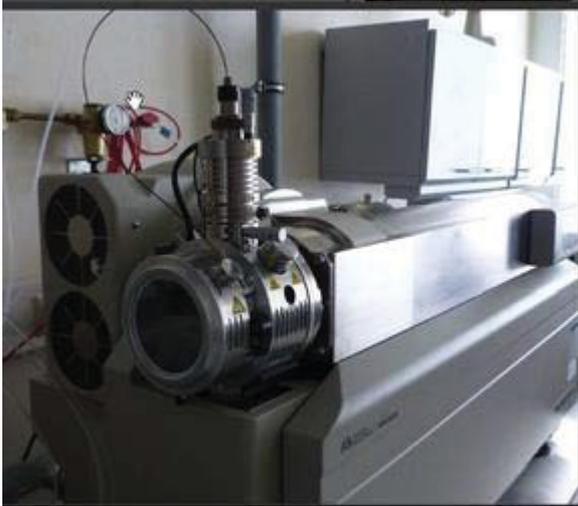


Abbildung 4: 400-Q-Trap Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems (<http://www.labexchange.com/de/laborgeraete-kaufen/d/?sn=23173> (04. Dezember 2013, 23.55 Uhr))

Das LC-System wurde mit einer Nucleodur-C₁₈-Pyramid-Säule (50 x 2,1mm, 3µm Partikelgröße) ausgestattet. Die Laufmittel waren 5mM Ammonium-Acetat (Laufmittel A) und Acetonitril (Laufmittel B). Der verwendete Gradient startete mit 10% B und wurde über 8min gleichmäßig auf 100% erhöht, daran schloss sich eine isokratische Phase von 3min bei 100% B an. Zur Reequilibrierung der Säule wurde ab 11,01min die Ausgangszusammensetzung der Laufmittel für 4min gefahren. Der Fluss betrug 250µl/min und das Injektionsvolumen 10µl.

Die Verdampfung des Laufmittels wurde durch eine Temperatur von 500°C in der Quelle unterstützt. Die Ionisierung des Elektrosprays, die graphisch in der Abbildung 5 zu sehen ist, erfolgte sowohl negativ als auch positiv, da sich die beiden Phtalate bei der Ionisierung sehr unterschiedlich verhielten. In der ersten Periode des Experimentes (0 bis 11,3min) erfolgte die Ionisierung im Negativen bei -4500V: Das Signal für MEHP war bei etwa 10,9min zu erwarten. Von 11,3 bis 15min erfolgte die Ionisierung im Positiven bei 5500V: Das Signal für DEHP war zu einer Retentionszeit von etwa 12,1min zu erwarten. Die Identität der Analyten wurde mit Hilfe von

substanzspezifischen Fragmentierungswegen im MRM (*Multiple Reaction Monitoring*)-Modus bestimmt. Als Kollisionsgas wurde Stickstoff verwendet.

Abbildung 5 zeigt schematisch den makro- und mikroskopischen ESI-Prozess

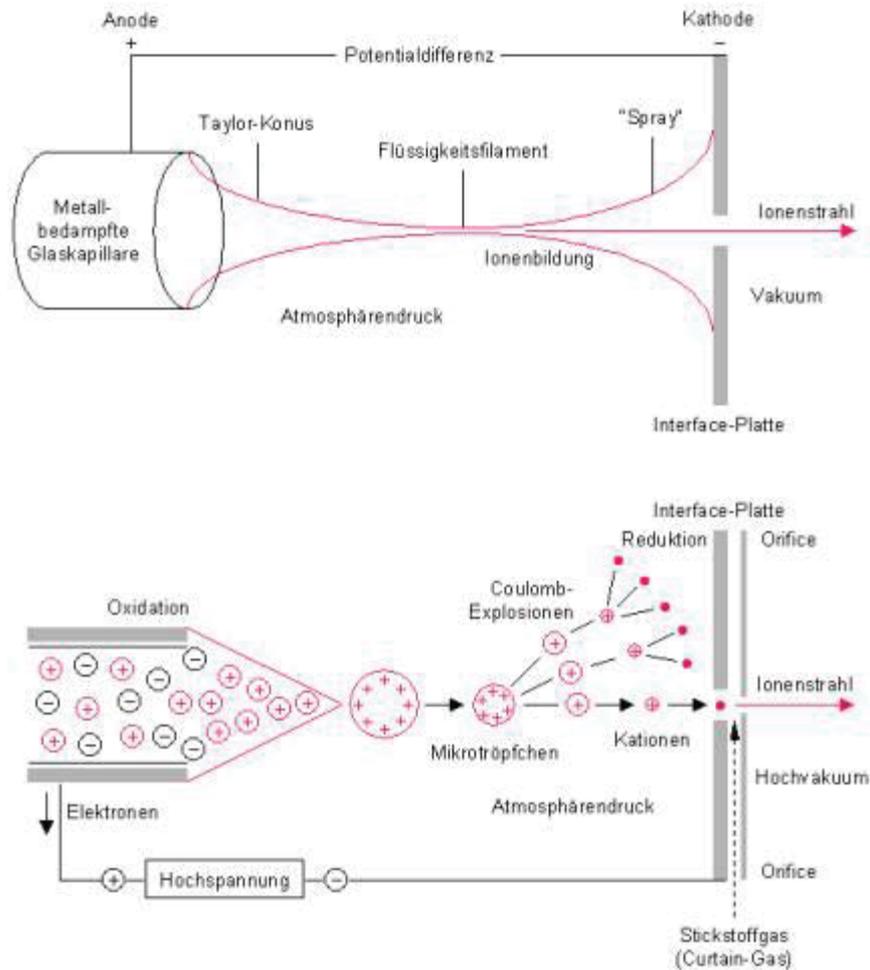


Abbildung 5: Schematische Darstellung des makroskopischen (oben) und mikroskopischen ESI-Prozesses. http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/BMFZ/mambo/index.php?option=com_content&task=view&id=28&Itemid=40 (05. Dezember 2013, 00.03 Uhr)

Für DEHP wurden die Produktionen des Vorläuferions m/z 391 $[M+H]^+$ gebildet. Bei einem *Declustering*-Potential von 41V und einer Kollisionsenergie zwischen 33 und 79V entstanden die Produktionen m/z 149 $[M+H]^+$, m/z 167 $[M+H]^+$ und m/z 121

$[M+H]^+$. Analog zum DEHP fragmentierte der isotope-markierte Standard D₄-DEHP mit dem Vorläuferion m/z 395 $[M+H]^+$ und bildete die Produktion m/z 153 $[M+H]^+$.

Für MEHP wurden die Produktionen des Vorläuferions m/z 277 $[M-H]^-$ gebildet. Bei einem *Declustering*-Potential von -44V und einer Kollisionsenergie zwischen -22 und -36V entstanden die Produktionen m/z 134 $[M-H]^-$, m/z 127 $[M-H]^-$ und m/z 77 $[M-H]^-$. Analog zum DEHP fragmentierte der isotope-markierte Standard ¹³C₄-MEHP mit dem Vorläuferion m/z 281 $[M-H]^-$ und bildete die Produktion m/z 137 $[M+H]^+$.

3.3.3 Validierungsparameter

3.3.3.1. DEHP – Methodencharakterisierung

Als Matrix wurde für die Methodencharakterisierung Plasma verwendet und die Probenvorbereitung wie unter Punkt 3.3.1.1. beschrieben durchgeführt. Es wurden die Präzision, die Linearität, die Wiederfindung und die Nachweisgrenze bestimmt.

Für DEHP wurde bei jedem Quantifizierungs-Ansatz eine Basiswertkorrektur vorgenommen, da es ubiquitär ist.

Tabelle 1 und 2 zeigen die Ergebnisse der Methodencharakterisierung für MEHP und DEHP im Plasma.

| Präzision | | | |
|------------------------|----------|-----------------------|--|
| | 50ng/ml | 500ng/ml | 5000ng/ml |
| Intraday n=6+6+6 | 13,8% | 11,0% | 4,5% |
| Interday n=18+18+18 | 17,6% | 8,2% | 8,2% |
| Linearität | | | |
| [ng/ml] | Steigung | Achsenabschnitt | Korrelationskoeffizient (r ²) |
| 20-80.000 | 2,81 | -1,13 | 0,9994 |
| Wiederfindung | | Nachweisgrenze | |
| 98% | | 20 ng/ml | |

Tab.1: Ergebnisse der Methodencharakterisierung für MEHP in Plasma.

| Präzision | | | |
|------------------------|----------|-----------------------|--|
| | 500ng/ml | 5.000ng/ml | 10.000ng/ml |
| Intraday n=6+6+6 | 11,7% | 2,4% | 4,4% |
| Interday n=18+18+18 | 22,2% | 5,1% | 11,6% |
| Linearität | | | |
| [ng/ml] | Steigung | Achsenabschnitt | Korrelationskoeffizient (r ²) |
| 300-1.200 | 0,015 | 1,74 | 0,9889 |
| Wiederfindung | | Nachweisgrenze | |
| 65% | | 150 ng/ml | |

Tab.2: Ergebnisse der Methodencharakterisierung für DEHP in Plasma.

3.4 Versuchsaufbau

Es wurden vom ermittelten Patientenkollektiv unmittelbar vor und nach jeder Apherese Blutbilder mit dem Blutzellzählgerät Abott Cell- Dyn 3500 angefertigt.

Den allogenen Spendern/innen wurden umgehend vor der Apherese und sofort im Anschluss der Apherese EDTA Blut (Blutröhrchen Fa. Becton Dickinson) zur Plasmagewinnung entnommen. Desweiteren wurden unverzüglich Proben vom fertigen Stammzellpräparat entnommen. Diese wurde zum Teil direkt zur Bestimmung der Phthalate DEHP und MEHP verwendet und teilweise für Lagerungsversuche, die im Weiteren näher beschrieben werden, benutzt. Um eine statistische Auswertung zu bekommen, mussten Proben von mindestens zehn allogenen Spendern/innen für die Lagerungsversuche herangezogen werden. Es wurde untersucht, ob die Temperatur einen möglichen Einfluss auf die Menge an den Phthalaten DEHP und MEHP hat. Dazu wurden drei sterile identische 600 ml Beutel, der Firma Fenwal mit 5 ml Plasma gefüllt und bei unterschiedlichen Temperaturen: 4°C, 37°C (Brutschrank 37°C, 5%CO₂ (Fa. Heraeus)) und -80°C für 72 Stunden gelagert. Zu festen Lagerungszeiten, d.h vor Beginn der Lagerung, nach 24 Stunden Lagerung und nach 72 Stunden Lagerung

wurden Proben entnommen und der Gehalt an den Phthalaten DEHP und MEHP gemessen. Parallel wurde der identische Versuch mit 5 ml 0,9% Natriumchlorid, anstatt des Plasmas durchgeführt, um zu schauen, ob die Zusammensetzung des Inhalts des Beutels einen Einfluss auf die Menge an den Phthalaten DEHP und MEHP hat. Um diesen Aspekt näher zu erforschen, wurden in einem weiteren Lagerungsversuch, wieder drei Beutel (s.o.) gefüllt: der eine Beutel mit Plasma, der zweite mit Apheresat und der dritte mit Plasma und Apheresat, das im Verhältnis von 3:1 gemischt wurde. Die Beutel wurden bei 4°C gelagert und Proben zu festen Zeiten entnommen: sofort, nach 24 Stunden, nach 48 Stunden und nach 72 Stunden und der Gehalt an den Phthalaten DEHP und MEHP gemessen.

Bei den autologen Stammzellspendern/innen wurden ebenfalls vor der Apherese und sofort im Anschluß der Apherese EDTA Blut zur Gewinnung von Plasma entnommen und die Phthalate DEHP und MEHP bestimmt. Außerdem wurden umgehend Proben vom Apheresat und von dem aufgetauten Apheresat entnommen, das bis zum Tag der Transfusion bei -175°C in flüssigem Stickstoff_Kryo- konserviert wurde. Auch von diesen Proben wurden die Phthalate DEHP und MEHP bestimmt.

Für die Gewinnung von Knochenmark wurden zehn Knochenmarkspendern/innen an den hinteren Beckenkämen Knochenmark entnommen. Von dem fertigen Produkt wurden schleunigst 5 ml in einen 600 ml Beutel, der Firma Fenwal unter sterilen Bedingungen gefüllt. Der Beutel wurde für 72 Stunden bei 4°C gelagert. Vor Beginn der Lagerung und nach einer Lagerung von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden wurden Proben aus dem Beutel entnommen und der Gehalt an den Phthalaten DEHP und MEHP bestimmt.

Die Apheresemaschinen wurden ohne an eine Person angeschlossen zu werden, unter den ansonsten realen Bedingungen laufen gelassen. Das ACD-A (500ml (Fa. Haemonetics)) wurde durch die NaCl-Lösung (Natriumchloridlösung 0,9% 1000ml (Fa. Baxter)) ersetzt. Der Rückfluss wurde in einen leeren Beutel geleitet. Anschließend wurden in zeitlichen Abständen von 30 Minuten aus den Rückflußschläuchen Proben entnommen und der Gehalt an den Phthalaten DEHP und MEHP bestimmt.

Nach einer erfolgreichen Apherese eines gesunden Spenders/ einer gesunden Spenderin, wurde während der Aufräumarbeiten an dem Apheresegerät der innere Ring nicht verworfen, sondern bei Raumtemperatur gelagert. Es wurden Proben direkt, nach 2

Stunden Lagerung und nach 24 Stunden Lagerung entnommen.. Aus den gesammelten Proben wurden die Phthalate DEHP und MEHP bestimmt.

Alle gesammelten Proben wurden mit dem Prinzip der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie-Tandem Massenspektrometrie, das am Anfang dieses Kapitels bereits ausführlich beschrieben wurde auf den Gehalt der Phthalate DEHP und MEHP untersucht.

4. Ergebnisse

1. Werte der Blutbilder aus peripherem Blut

Als Grundlage für die weitere Ergebnisdarstellung wurde zunächst das Blutbild der autologen Stammzellspendern/innen und der allogenen Stammzellspendern/innen verglichen. Der Fokus lag auf dem Blutzellgehalt und den Nierenparameter Creatinin und der glomerulären Filtrationsrate. Die Kernfrage lautete, ob ein statistisch signifikanter Unterschied im Zellgehalt des peripheren Blutes der beiden Gruppen nachweisbar ist. Die Tabelle 1 zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichungen der angefertigten Blutbilder aus dem peripheren Blut der allogenen und autologen Stammzellspendern/innen vor und nach der Apherese. Tabelle 1 kann entnommen werden, dass die autologen und die allogenen Stammzellspender/innen vor der Apherese im Durchschnitt höhere Werte an allen Blutzellen im peripheren Blut hatten als nach der Apherese. Die autologen Stammzellspender/innen wiesen im Vergleich zu den allogenen Stammzellspendern/innen in allen untersuchten Blutparametern statistisch signifikant niedrigere Werte auf ($p < 0,05$, Student's t-Test). Der $CD34^+$ Zellgehalt wurde bei beiden untersuchten Gruppen nur vor der Apherese erfasst. Der Gehalt an den absoluten $CD34^+$ Zellen war bei den autologen Stammzellspendern statistisch signifikant erhöht ($p < 0,05$, Student's t-Test).

Tabelle 1: Mittelwerte und Standardabweichungen der angefertigten Blutbilder des peripheren Blutes der autologen und allogenen Stammzellspendern vor und nach der Apherese

| | Allogene Spender | | Autologe Spender | |
|---|------------------|-----------|------------------|-----------|
| | vor PBSC | nach PBSC | vor PBSC | nach PBSC |
| Leukozyten(K/ μ l) | 44,3 | 41,4 | 23,8 | 19 |
| Leukozyten(K/ μ l) Standardabweichung | 13,2 | 13,3 | 16,9 | 14,4 |
| Hb(g/dl) | 14,2 | 13,5 | 9,9 | 9,1 |
| Hb(g/dl) Standardabweichung | 0,6 | 0,7 | 1,1 | 1 |
| Hkt(%) | 43 | 41 | 30 | 28 |
| Hkt(%) Standardabweichung | 1,9 | 2 | 3,46 | 3 |
| Erythrozytenzahl(M/uL) | 4,9 | 4,7 | 3,4 | 3,1 |
| Erythrozytenzahl(M/uL) Standardabweichung | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,4 |
| Thrombozyten(K/ μ l) | 242 | 132 | 121 | 72 |
| Thrombozyten(K/ μ l) Standardabweichung | 58,8 | 38,8 | 99,3 | 47,9 |
| CD 34+(10 ⁶ /kg KG) | 2,59 | | 3,57 | |
| CD 34+(10 ⁶ /kg KG) Standardabweichung | 0,7 | | 2,7 | |

Die unterschiedliche Konzentration an Leukozyten zwischen der allogenen und der autologen Gruppe und innerhalb der Gruppen zu den verschiedenen Messzeitpunkten (vor bzw. nach der Apherese) wird graphisch in der Abbildung 1 dargestellt.

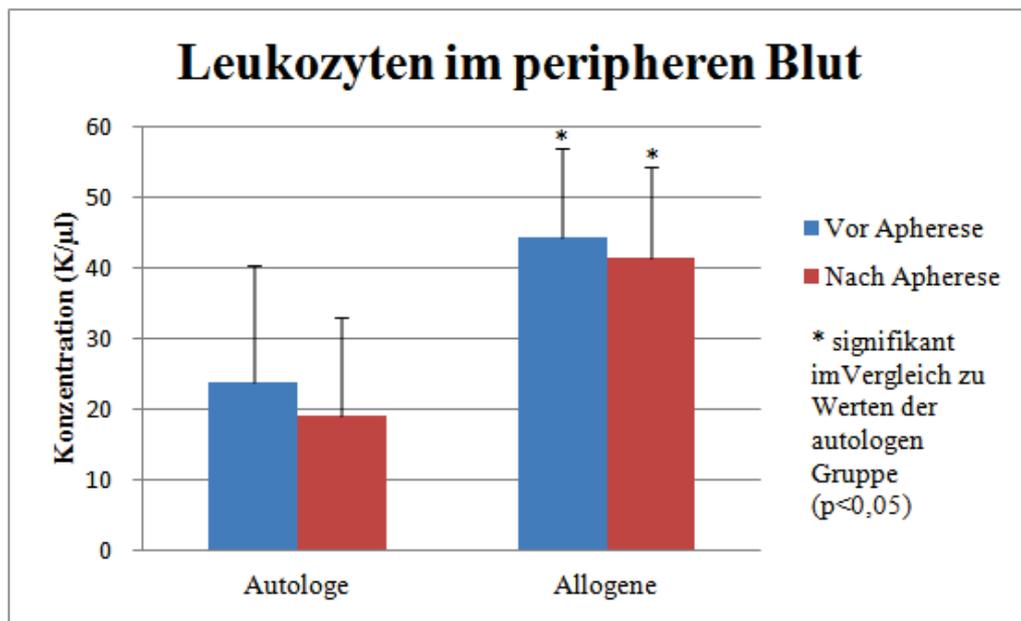


Abbildung 1: Mittelwerte und Standardabweichungen der Leukozyten-Konzentrationen [K/ μ l] aus dem peripheren Blut autologer (n= 20) und allogener (n=21) Spender/innen je vor und nach der Apherese

Auch der Unterschied im Gehalt an Thrombozyten im peripheren Blut zwischen der allogenen und der autologen Gruppe und innerhalb der Gruppen zu den verschiedenen Messzeitpunkten (vor bzw. nach der Apherese) wird graphisch in der Abbildung 2 dargestellt.

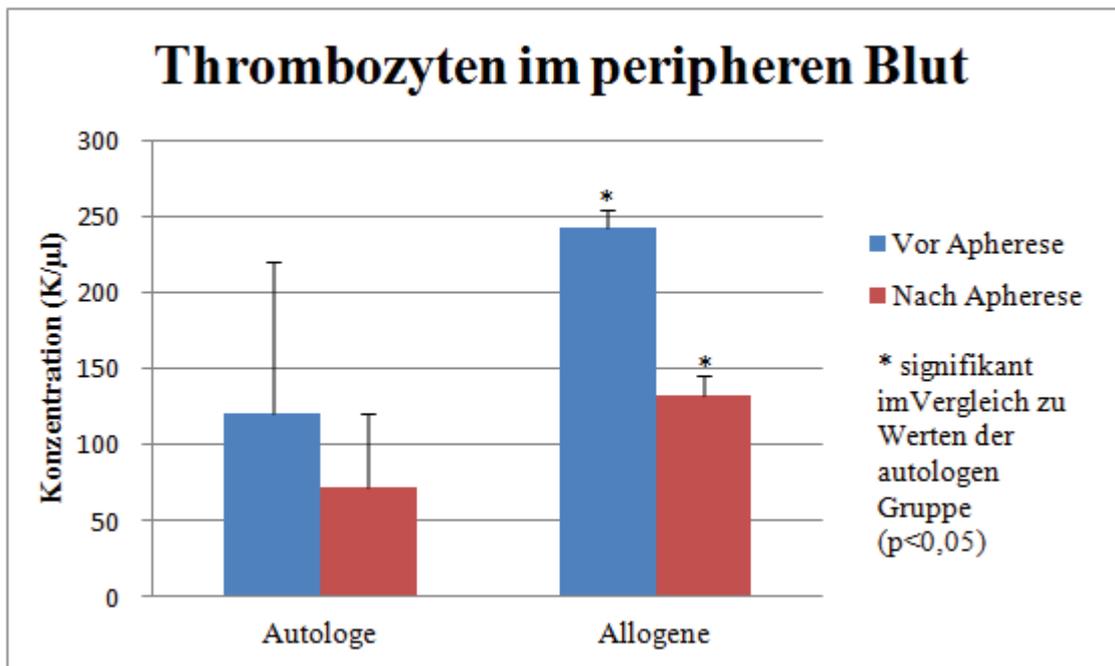


Abbildung 2: Mittelwerte und Standardabweichungen der Thrombozyten-Konzentrationen [K/µl] aus dem peripheren Blut autologer (n= 20) und allogener (n=21) Spender/innen vor und nach Apherese.

Nun wurde die Konzentration des Hämoglobins zwischen den beiden Vergleichsgruppen visualisiert. Erneut wurden auch die Werte zu den zwei Meßzeitpunkten vor und nach der Apherese innerhalb der Gruppen aufgetragen (Abbildung 3).

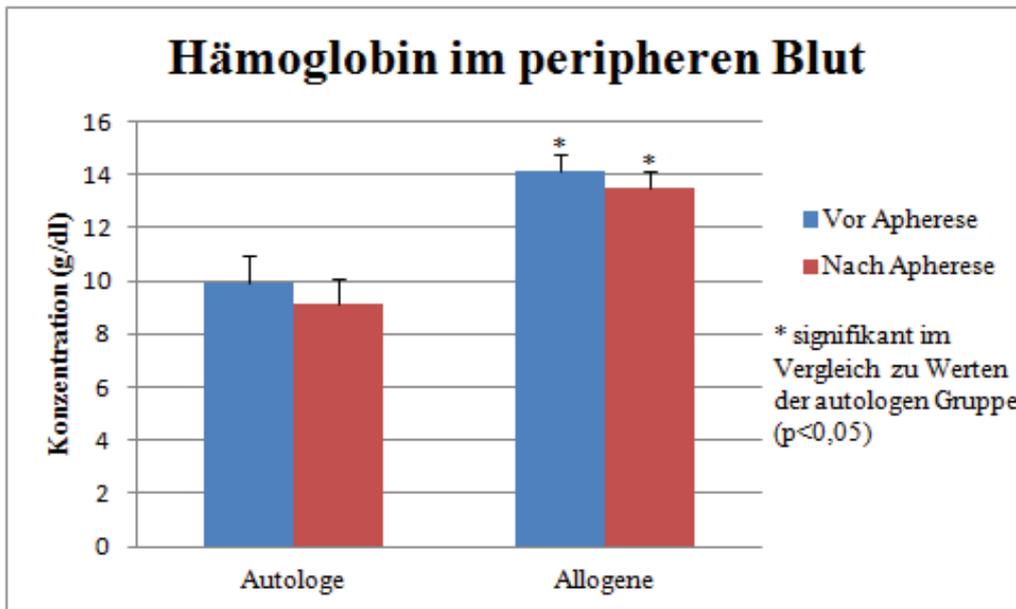


Abbildung 3: Mittelwerte und Standardabweichungen der Hämoglobin-Konzentrationen [g/dl] aus dem peripheren Blut autologer (n= 20) und allogener (n=21) Spender vor und nach Apherese

Schließlich wurde noch der Hämatokrit zwischen den beiden Gruppen der allogenen und der autologen Spender/innen graphisch dargestellt. Auch hier wurden die Messwerte vor und nach der Apherese innerhalb der einzelnen Gruppe aufgezeichnet (Abbildung 4).

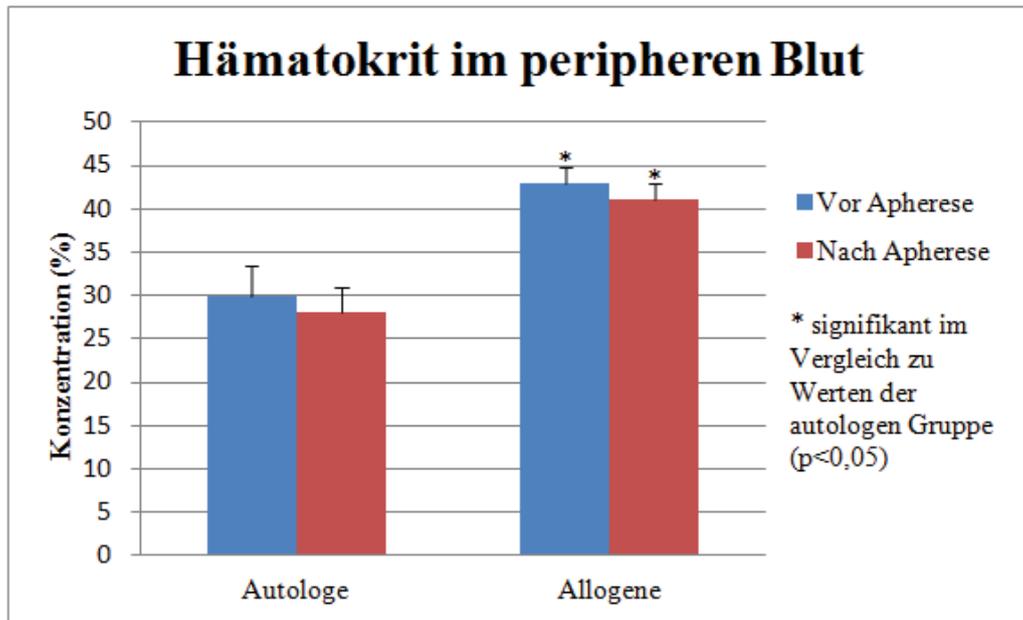


Abbildung 4: Mittelwerte und Standardabweichungen der Hämatokrit-Bestimmung [%] aus dem peripheren Blut autologer (n= 20) und allogener (n=21) Spender/innen vor und nach Apherese

2. Bestimmung der Phthalate DEHP und MEHP aus dem peripheren Blut.

Die Blutpräparate der allogenen und autologen Spender wurden nun auf den Gehalt der im Plasma enthaltenen Phthalate DEHP und MEHP ausgewertet und verglichen. Die Tabelle 2 zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichungen von MEHP und DEHP der allogenen und autologen Stammzellspender/innen vor und nach der Apherese. Bei den allogenen Spendern/innen lag der durchschnittlich ermittelte Wert für das DEHP vor der Apherese unter der Nachweisgrenze. Nach der Apherese stieg er statistisch nicht signifikant auf einen Mittelwert von $0,09 \mu\text{g/ml} \pm 0,19$ an ($p > 0,05$, Student's t-Test). Bei den autologen Spendern/innen lag der Mittelwert für das DEHP vor der Apherese bereits bei $0,22 \mu\text{g/ml} \pm 0,17$ und zeigte nach der Apherese einen statistisch signifikant angestiegenen Mittelwert von $0,88 \mu\text{g/ml} \pm 0,42$ an ($p < 0,05$ Student's t-Test). Bei den allogenen Spendern/innen lag der durchschnittlich ermittelte Wert für das MEHP vor der Apherese unter der Nachweisgrenze. Nach der Apherese war er mit einem Wert von $0,12 \mu\text{g/ml} \pm 0,06$ statistisch nicht signifikant angestiegen ($p > 0,05$, Student's t-Test). Bei den autologen Spendern/innen ist das MEHP nicht nachweisbar.

Tabelle 2: Mittelwerte und Standardabweichungen von MEHP und DEHP aus dem peripheren Blut autologer (n= 20) und allogener (n=21) Spender/innen vor und nach Apherese

| | Allogene Spender | | Autologe Spender | |
|---------------------------------|-------------------------|---------------|-------------------------|---------------|
| | vor Apherese | nach Apherese | vor Apherese | nach Apherese |
| MEHP (µg/ml) Mittelwert | 0 | 0,12 | 0 | 0 |
| MEHP (µg/ml) Standardabweichung | 0 | 0,06 | 0 | 0 |
| DEHP (µg/ml) Mittelwert | 0 | 0,09 | 0,22 | 0,88 |
| DEHP (µg/ml) Standardabweichung | 0 | 0,19 | 0,17 | 0,42 |

3. Bestimmung der Phthalate DEHP und MEHP aus dem Apheresat autologer Spender/innen.

Im Folgenden sollte die Frage geklärt werden, ob die Phthalate DEHP und MEHP im Apheresat autologer Stammzellspender/innen vorhanden sind und inwiefern die Lagerungszeit und die Lagerungstemperatur Einfluss auf den Gehalt der Phthalate hat. Dafür wurde das nach einer erfolgreichen Stammzellapherese gewonnene Apheresat der autologen Spender/innen direkt im Anschluss der Apherese auf das Vorhandensein von DEHP und MEHP untersucht. Der aus dem fertigen Apheresat unmittelbar ermittelte durchschnittliche Wert lag für das DEHP bei $5,2 \mu\text{g/ml} \pm 3,3$ und für das MEHP bei $0,29 \mu\text{g/ml} \pm 0,28$.

Als nächstes galt es die Frage zu beantworten, ob die Lagerungszeit und die Lagerungstemperatur Einfluss auf den Gehalt an DEHP und MEHP hatten. Um diese Frage zu beantworten, wurden die Apheresate der autologen Spender/innen nach Lagerung mittels Kryokonservierung zum Zeitpunkt der Retransfusion erneut auf das Vorhandensein von DEHP und MEHP untersucht und mit den Werten zum Zeitpunkt der Apherese verglichen. Die Lagerungszeit betrug im Durchschnitt 47 Tage bei einer Temperatur von -175°C . Nach der Lagerung mittels Kryokonservierung stieg der DEHP Wert auf einen Mittelwert von $7,07 \mu\text{g/ml} \pm 5,54$ statistisch signifikant an ($p < 0,05$, Student's t-Test). Der MEHP Wert stieg durchschnittlich auf $0,57 \mu\text{g/ml} \pm 0,59$ ebenfalls statistisch signifikant an ($p < 0,05$, Student's t-Test).

Der Gehalt an den Phthalaten MEHP und DEHP im Apheresat autologer Spender/innen zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (unmittelbar nach Apherese und nach einer Lagerungszeit von Durchschnittlich 47 ± 28 Tagen) wurde graphisch dargestellt (Abbildung 5).

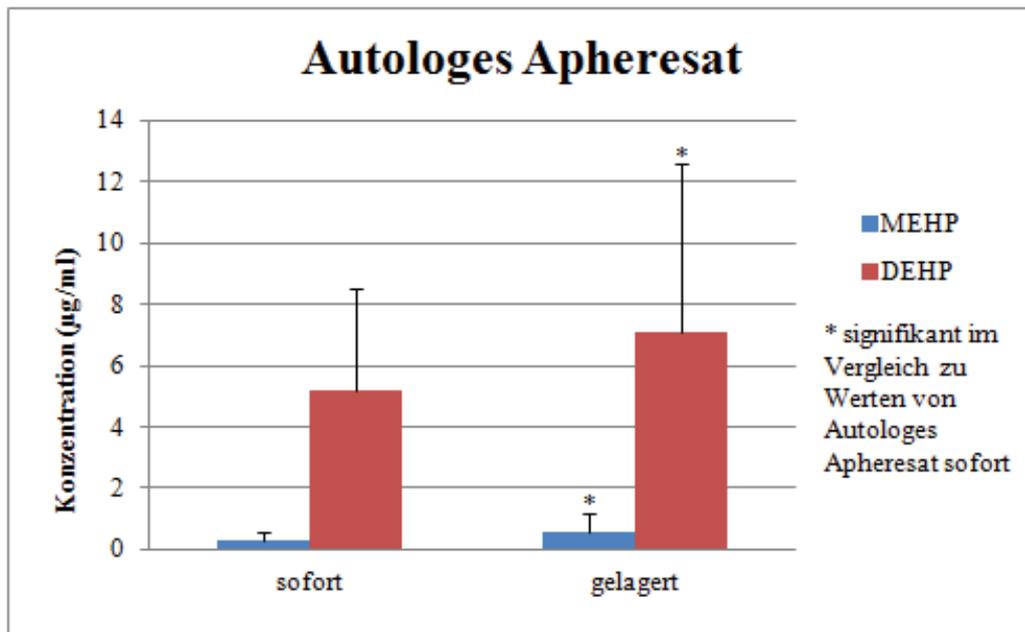


Abbildung 5: Mittelwerte und Standardabweichungen von DEHP und MEHP aus dem Präparat autologer Stammzellapheresate (n=14) umgehend nach der Apherese und nach Lagerung von durchschnittlich 47 ± 28 Tagen

3.1 Bestimmung der Phthalate DEHP und MEHP aus dem Apheresat allogener Spender/innen

Als nächstes wurde geprüft, ob die Phthalate DEHP und MEHP auch im Apheresat allogener Spender/innen vorhanden sind. Dazu wurden unmittelbar nach der Apherese der allogenen Stammzellspender/innen aus dem Apheresat das DEHP und das MEHP bestimmt. Bei den allogenen Spendern/innen lag der Mittelwert für das MEHP aus dem unmittelbaren Apheresat bei $0,92 \mu\text{g/ml} \pm 0,51$. Der Mittelwert für das DEHP lag bei $10,07 \mu\text{g/ml} \pm 4,40$.

3.2 Vergleich des Gehalts an DEHP und MEHP im Apheresat autologer und allogener Stammzellspender/innen

Im Anschluss wurde der Frage nachgegangen, ob es einen statistisch signifikanten Unterschied in dem Gehalt an MEHP und DEHP in dem Apheresat der allogenen und autologen Stammzellspender/innen gibt. Tabelle 3 zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Phthalate MEHP und DEHP aus dem Apheresat der allogenen und autologen Stammzellspender/innen sofort nach der Apherese. Die Apheresate der allogenen Stammzellspender/innen wiesen einen statistisch signifikant höheren Gehalt sowohl an MEHP als auch an DEHP auf ($p < 0,05$, Student's t-Test).

Tabelle 3: Mittelwerte und Standardabweichungen von MEHP und DEHP aus dem Apheresat autologer (n= 20) und allogener (n=21) Spender/innen unmittelbar nach Apherese

| | Allogene Spender | Autologe Spender |
|--|-------------------------|-------------------------|
| | Apheresat sofort | |
| MEHP ($\mu\text{g/ml}$) Mittelwert | 0,92 | 0,29 |
| MEHP ($\mu\text{g/ml}$) Standardabweichung | 0,51 | 0,28 |
| DEHP ($\mu\text{g/ml}$) Mittelwert | 10,07 | 5,2 |
| DEHP ($\mu\text{g/ml}$) Standardabweichung | 4,4 | 3,3 |

Die Abbildung 6 zeigt graphisch die Mittelwerte und Standardabweichungen des Gehalts an MEHP und DEHP im Apheresat autologer und allogener Stammzellspender/innen umgehend nach der Apherese

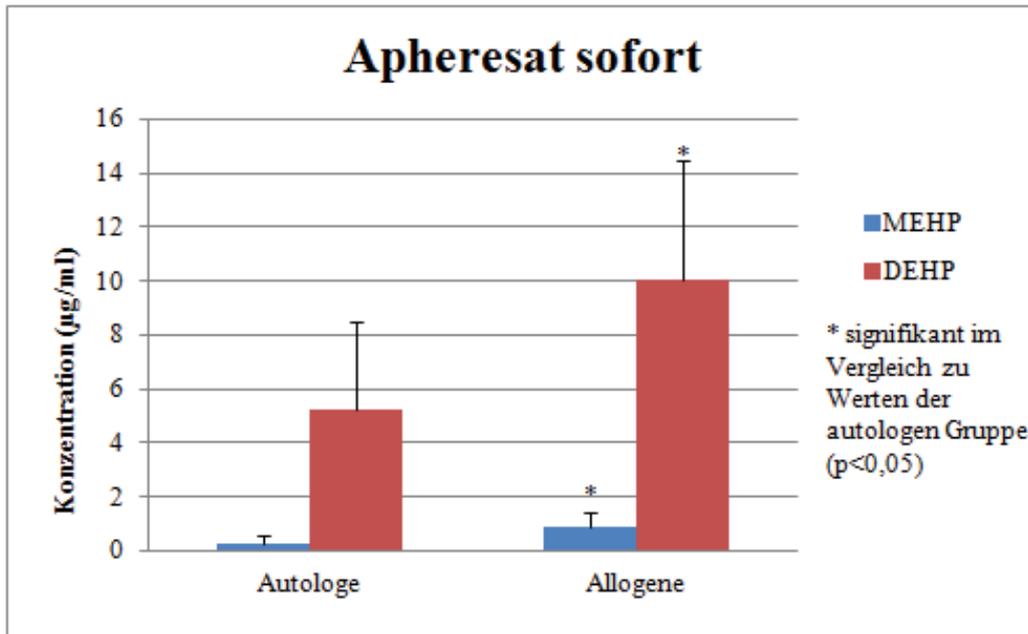


Abbildung 6: Mittelwerte und Standardabweichungen von DEHP und MEHP aus dem Apheresat autologer (n=14) und allogener (n=21) Stammzellspender/innen umgehend nach der Apherese

4. Bestimmung der Phthalate DEHP und MEHP in Knochenmark-Präparaten allogener Knochenmarkspender/innen

Als nächstes sollte die Frage beantwortet werden, ob im Knochenmarkpräparat allogener Knochenmarkspender/innen die Phthalate MEHP und DEHP nachweisbar sind. Zusätzlich wurde geprüft, inwiefern die Zeitdauer der Lagerung einen Einfluss auf den Gehalt an DEHP und MEHP im Knochenmarkpräparat allogener Knochenmarkspender/innen hat. Die Lagerung erfolgte für 72 Stunden bei 4°C. Zunächst wurden die Phthalate DEHP und MEHP unmittelbar nach der Knochenmarkentnahme aus dem Knochenmarkpräparat bestimmt, was im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Lagerungsstunde 0 bezeichnet wird. Im Anschluss folgten die weiteren Untersuchungen auf den Gehalt an DEHP und MEHP aus dem gelagerten Knochenmarkpräparat nach 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden. Die Tabelle 4 stellt die Mittelwerte und die Standardabweichungen des Gehalts an DEHP und MEHP

im allogenen Knochenmarkpräparat zum Zeitpunkt der Knochenmarkentnahme und nach einer Lagerung von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden dar. Der Tabelle 4 kann entnommen werden, dass der Gehalt an MEHP in 72 Stunden zunimmt. Vergleicht man die Werte des Gehalts an MEHP vom Zeitpunkt 0, nach 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden, so ist zunächst einmal festzuhalten, dass MEHP im Knochenmarkpräparat allogener Knochenmarkspender/innen vorhanden ist. Weiterhin ist ein statistisch signifikanter Anstieg festzustellen ($p < 0,05$, Student's t-Test). Auch ist DEHP im Knochenmarkpräparat zum Zeitpunkt der Knochenmarkspende nachweisbar. Nach einer Lagerung von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden ist ein Anstieg zu erkennen, der ebenfalls statistisch signifikant ist ($p < 0,05$, Student's t-Test).

Tabelle 4: Mittelwerte und Standardabweichungen von MEHP und DEHP aus dem Knochenmarkpräparat allogener (n=10) Knochenmarkspender/innen unmittelbar nach der Knochenmarkspende und nach Lagerung über 72 Stunden (Stunden=h) bei 4°C

| | Knochenmarkpräparat | | | |
|---------------------------------|--------------------------------|------|-------|-------|
| | Lagerung in Stunden (h) | | | |
| | 0 | 24 | 48 | 72 |
| MEHP (µg/ml) Mittelwert | 0,2 | 13,5 | 20,1 | 37,1 |
| MEHP (µg/ml) Standardabweichung | 0,1 | 12,6 | 7,7 | 22,1 |
| DEHP (µg/ml) Mittelwert | 1,5 | 92,2 | 143,4 | 196,9 |
| DEHP (µg/ml) Standardabweichung | 2,2 | 78,9 | 28 | 65,3 |

In der Abbildung 7 werden die Mittelwerte und die Standardabweichungen von dem Gehalt an MEHP und DEHP aus den Knochenmarkpräparaten allogener Knochenmarkspender/innen vom Zeitpunkt der Knochenmarkspende und nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden bei 4°C graphisch veranschaulicht.

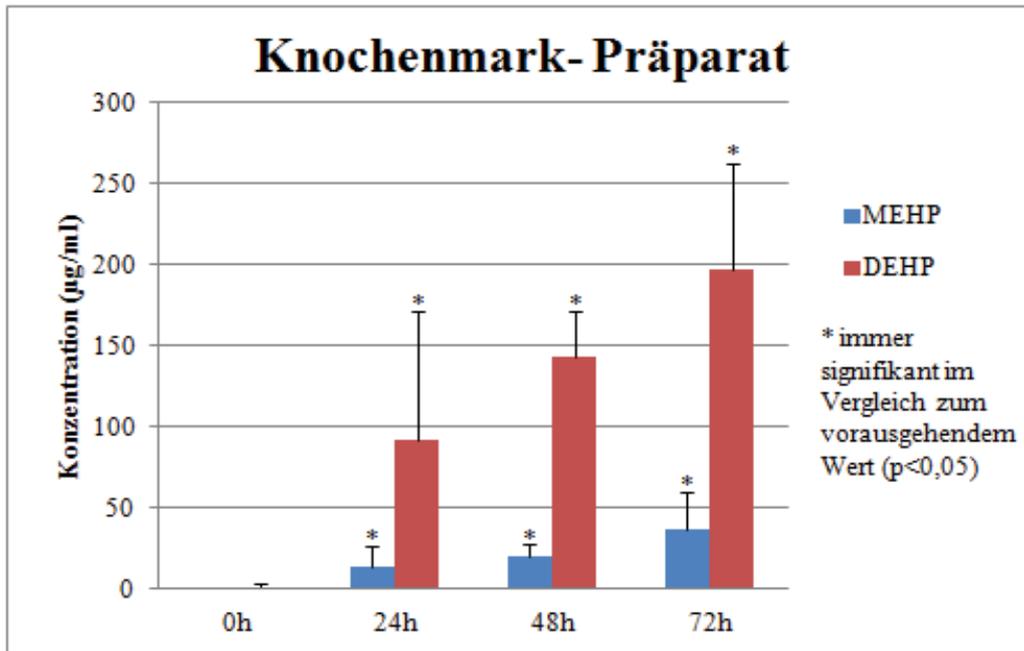


Abbildung 7: Mittelwerte und Standardabweichungen von MEHP und DEHP aus Knochenmarkpräparaten allogener Knochenmarkspender/innen (n=10) zum Zeitpunkt der Knochenmarkspende und nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden bei 4°C.

4.1 Vergleich des Knochenmarkpräparats und des Stammzellapheresats der allogenen Spender/innen

In der Folge wurden der Gehalt an DEHP und MEHP aus den Knochenmarkpräparaten allogener Knochenmarkspender/innen und den Apheresaten allogener Stammzellspender/innen miteinander verglichen und in einen statistischen Zusammenhang gebracht. Daraus ergab sich, dass der Gehalt an MEHP und DEHP in den Apheresaten allogener Stammzellspender/innen statistisch signifikant höher war, als in den Knochenmarkpräparaten allogener Knochenmarkspender/innen ($p < 0,05$, Student's t-Test).

Die Abbildung 8 stellt graphisch die Mittelwerte und Standardabweichungen an MEHP und DEHP in Knochenmarkpräparaten allogener Knochenmarkspender/innen und allogener Stammzellspender/innen im Anschluss der Spenden dar.

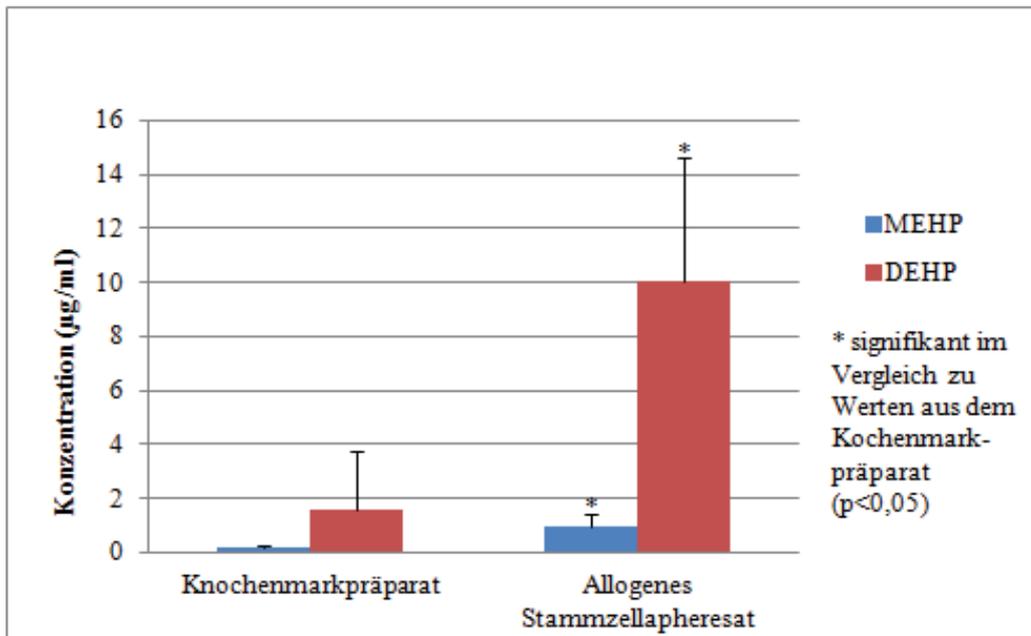


Abbildung 8: Mittelwerte und Standardabweichungen der Phthalate DEHP und MEHP in Knochenmarkpräparaten allogener Knochenmarkspender/innen (n=10) und in Apheresaten allogener Stammzellspender/innen (n=21) unmittelbar nach der Spende

5. Lagerung von Plasma, Apheresat und Plasma+Apheresat allogener Stammzellspender/innen

Als nächstes wurde untersucht, ob es einen Unterschied im Gehalt an DEHP und MEHP im reinen Plasma, in reinem Apheresat und in einem Gemisch aus Plasma und Apheresat (Mischungsverhältnis von 3:1) gibt. Zusätzlich wurde untersucht, welchen Einfluss die Lagerungszeit auf den Gehalt an DEHP und MEHP in den eben erwähnten Substanzen hat. Das Plasma, das Apheresat und das Gemisch aus Plasma und Apheresat (Mischungsverhältnis von 3:1) wurden bei 4°C über 72 Stunden gelagert. Es wurden aus ihnen der Gehalt an DEHP und MEHP untersucht vor Beginn der Lagerung, nach 24 Stunden, nach 48 Stunden und nach 72 Stunden. Die Tabellen 5- 7 stellen die Mittelwerte und die Standardabweichungen von DEHP und MEHP im reinen Plasma (Tabelle 5), reinem Apheresat (Tabelle 6) und im Gemisch von Plasma und Apheresat (Mischungsverhältnis 3:1) (Tabelle 7) vor Beginn der Lagerung und nach einer Lagerung von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden. Die Messergebnisse zu den einzelnen Zeitpunkten wurden für jede zu untersuchende Substanz miteinander verglichen und statistisch ausgewertet. Der Tabelle 5 ist zu entnehmen, dass im Plasma der Gehalt an DEHP vom Zeitpunkt vor Beginn der Lagerung bis zu einer Lagerung von 72 Stunden zunimmt. Statistisch handelt es sich um einen signifikanten Anstieg ($p < 0,05$, Student's t-Test).

| Plasma | | | | |
|---------------------------------|--------------------------------|------|-------|-------|
| | Lagerung in Stunden (h) | | | |
| | 0 | 24 | 48 | 72 |
| MEHP (µg/ml) Mittelwert | 26 | 9,7 | 20,8 | 38,5 |
| MEHP (µg/ml) Standardabweichung | 2,1 | 6,1 | 10,6 | 19,5 |
| DEHP (µg/ml) Mittelwert | 17,9 | 86,8 | 148,5 | 183,5 |
| DEHP (µg/ml) Standardabweichung | 12,5 | 58,9 | 74 | 81,7 |

Tabelle 5: Mittelwerte und Standardabweichungen von MEHP und DEHP in Plasmen allogener peripherer Stammzellspender/innen (n=10) vor Beginn der Lagerung und nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden bei 4°C

Die Abbildung 9 veranschaulicht den oben beschriebenen Zusammenhang graphisch.

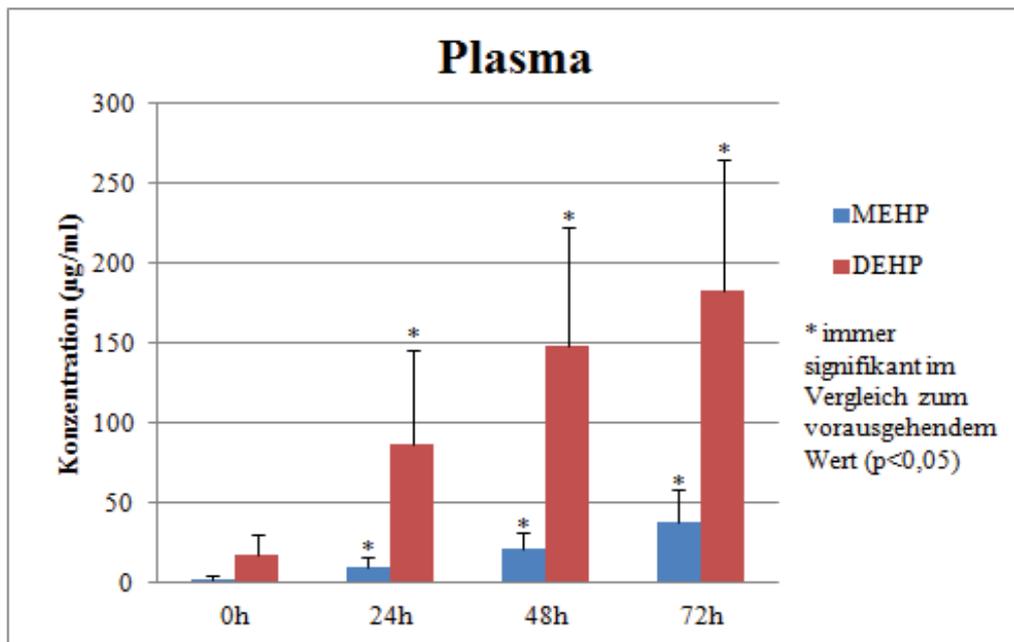


Abbildung 9: Mittelwerte und Standardabweichungen von MEHP und DEHP in Plasmen allogener peripherer Stammzellspender/innen (n=10) vor Beginn der Lagerung und nach einer Lagerung von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden bei 4°C

Der Gehalt an MEHP und DEHP im Apheresat allogener peripherer Stammzellspender/innen zum Zeitpunkt vor Beginn der Lagerung und nach 24 Stunden, 24 Stunden und 72 Stunden sind der Tabelle 6 zu entnehmen. Die Messergebnisse für das MEHP und für das DEHP steigen innerhalb der Lagerungszeit von 72 Stunden statistisch signifikant an ($p < 0,05$, Student's t-Test).

Tabelle 6: Mittelwert und Standardabweichungen von MEHP und DEHP im Apheresat allogener peripherer Stammzellspender/innen (n=10) vor Beginn der Lagerung und nach einer Lagerung von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden bei 4°C

| Apheresat | | | | |
|---------------------------------|--------------------------------|-------|-------|-------|
| | Lagerung in Stunden (h) | | | |
| | 0 | 24 | 48 | 72 |
| MEHP (µg/ml) Mittelwert | 2 | 7,6 | 12,1 | 20,9 |
| MEHP (µg/ml) Standardabweichung | 0,8 | 1,8 | 1,3 | 7 |
| DEHP (µg/ml) Mittelwert | 27,4 | 100,3 | 144,9 | 234,1 |
| DEHP (µg/ml) Standardabweichung | 10 | 37,9 | 46,9 | 52,2 |

Dieser Zusammenhang wird visuell an der Abbildung 10 veranschaulicht.

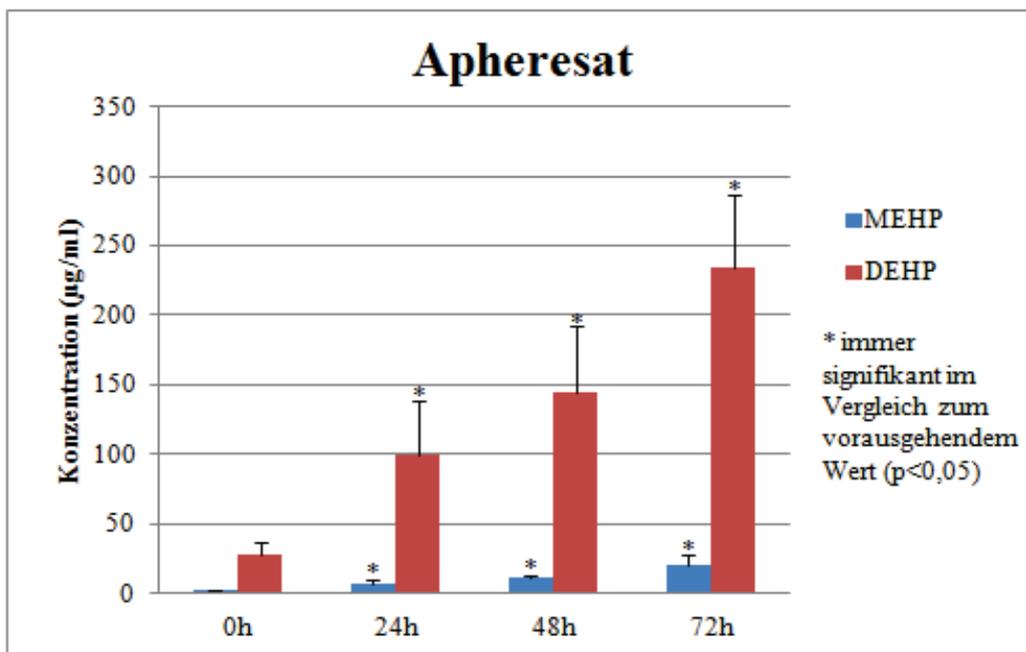


Abbildung 10: Mittelwerte und Standardabweichungen von MEHP und DEHP in Apheresat allogener peripherer Stammzellspender/innen (n=10) vor Beginn der Lagerung und nach einer Lagerung von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden bei 4°C

In dem Gemisch aus Plasma und Apheresat (3:1) allogener peripherer Stammzellspender wurde der Gehalt an MEHP und DEHP untersucht. Die erste Messung erfolgte vor Beginn der Lagerung bei 4°C. Die weiteren Messungen erfolgten nach einer Lagerung von 24 Stunden, nach 48 Stunden und nach 72 Stunden bei 4°C. Die Ergebnisse der Mittelwerte und der Standardabweichungen des Gehalts an MEHP

und DEHP in dem Gemisch aus Plasma und Apheresat (3:1) sind in der Tabelle 7 zusammengefasst. Vergleicht man für das MEHP die Messwerte vom Zeitpunkt 0, 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden, so ist ein statistisch signifikanter Anstieg festzustellen ($p < 0,05$, Student's t-Test). Auch für das DEHP lässt sich ein statistisch signifikanter Anstieg der Messwerte im Gemisch aus Plasma und Apheresat (3:1) vom Zeitpunkt vor Beginn der Lagerung bis zu einer Lagerungszeit von 72 Stunden errechnen ($p < 0,05$, Student's t-Test).

Tabelle 7: Mittelwert und Standardabweichungen von MEHP und DEHP im Gemisch aus Plasma und Apheresat (3:1) allogener peripherer Stammzellspender/innen (n=10) vor Beginn der Lagerung und nach einer Lagerung von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden bei 4°C

| Gemisch aus Plasma und Apheresat (3:1) | | | | |
|---|--------------------------------|------|-------|------|
| | Lagerung in Stunden (h) | | | |
| | 0 | 24 | 48 | 72 |
| MEHP (µg/ml) Mittelwert | 1,1 | 3,9 | 14,4 | 24,8 |
| MEHP (µg/ml) Standardabweichung | 0,9 | 3 | 4,8 | 10,8 |
| DEHP (µg/ml) Mittelwert | 23,3 | 63,9 | 144,5 | 166 |
| DEHP (µg/ml) Standardabweichung | 15,4 | 38,3 | 23,2 | 83,9 |

Graphisch wird der oben beschriebene Zusammenhang im Gemisch aus Plasma und Apheresat (3:1) in der Abbildung 11 dargestellt.

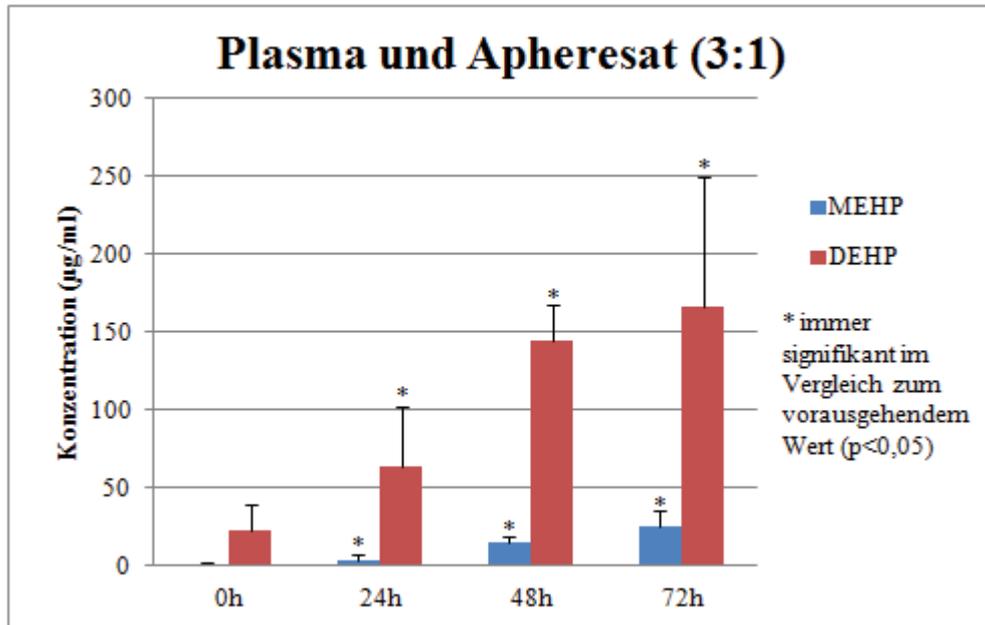


Abbildung 11: Mittelwerte und Standardabweichungen von MEHP und DEHP im Gemisch aus Plasma und Apheresat (3:1) allogener peripherer Stammzellspender/innen (n=10) vor Beginn der Lagerung und nach einer Lagerung von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden bei 4°C

5.1 Verhältnis von DEHP zu MEHP im Plasma, Apheresat und dem Gemisch aus Plasma und Apheresat (3:1) allogener peripherer Stammzellspender/innen während einer Lagerung über 72 Stunden

Nachfolgend wurde analysiert, inwiefern sich das Verhältnis von DEHP zu MEHP während einer Lagerung über 72 Stunden im Plasma, im Apheresat und in einem Gemisch aus Plasma und Apheresat (3:1) ändert. Die Tabelle 8 stellt die Mittelwerte und die Standardabweichungen des Verhältnisses von DEHP zu MEHP während einer Lagerungszeit von 72 Stunden im reinen Apheresat, in reinem Plasma und in einem Gemisch aus Plasma und Apheresat (3:1) zusammen. Im reinen Apheresat ist kein statistisch signifikanter Zusammenhang im Verhältnis DEHP zu MEHP über eine

Lagerungszeit von 72 Stunden nachweisbar. In reinem Plasma dagegen ist ein statistisch signifikanter Abfall während der Lagerungszeit von 72 Stunden zu beobachten ($p < 0,05$, Student's t-Test). Im Gemisch aus Plasma und Apheresat (3:1) ist ebenfalls ein statistisch signifikanter Abfall des Verhältnisses von DEHP zu MEHP während der Lagerungszeit über 72 Stunden festzustellen ($p < 0,05$, Student's t-Test).

Tabelle 8: Mittelwerte und Standardabweichungen des Verhältnisses von DEHP zu MEHP während einer Lagerung über 72 Stunden im reinen Apheresat, im reinen Plasma und im Gemisch aus Plasma und Apheresat (3:1)

| Verhältnis von DEHP zu MEHP | | | | |
|--|----------|-----------|-----------|-----------|
| Stunden | 0 | 24 | 48 | 72 |
| Apheresat Mittelwert | 12,2 | 13,8 | 12,2 | 13,2 |
| Apheresat Standardabweichung | 2,4 | 6,3 | 4 | 4,7 |
| Plasma Mittelwert | 11,4 | 10,3 | 8,1 | 6,1 |
| Plasma Standardabweichung | 11,4 | 6,8 | 6,1 | 4,8 |
| Plasma+ Apheresat (3:1) Mittelwert | 21,4 | 14,9 | 9,8 | 7,3 |
| Plasma+ Apheresat (3:1) Standardabweichung | 7,4 | 1,7 | 4,9 | 1,8 |

6. Lagerung von Plasma allogener peripherer Stammzellspender/innen bei 4°C, 37°C und -80°C

Im Anschluss wurde erprobt, welchen Einfluss die Temperatur auf den Gehalt an MEHP und DEHP im Plasma hat. Dafür wurde Plasma, welches von allogenen peripheren Stammzellspender/innen gewonnen wurde, für 72 Stunden bei 4°C, bei 37°C und bei -80°C gelagert. Vor Beginn der Lagerung wurde der Gehalt an MEHP und DEHP gemessen. Im Laufe der Lagerung erfolgte nach 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden eine erneute Messung jeweils aus dem Plasma, welches bei 4°C, bei 37°C und -80°C gelagert wurde. Die Tabellen 8-10 veranschaulichen die Mittelwerte und die Standardabweichung des Gehalts an MEHP im Plasma, welches bei -80°C (Tabelle 9), 4°C (Tabelle 10) und 37°C (Tabelle 11) gelagert wurde.

Der Gehalt an MEHP im Plasma der allogene peripheren Stammzellspender/innen, welches bei -80°C über 72 Stunden gelagert wurde, steigt wie der Tabelle 8 zu entnehmen ist, in den ersten 48 Stunden und zeigt nach 72 Stunden einen Abfall. Die Messwerte zum Zeitpunkt 0, 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden sind statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$, Student's t-Test).

Tabelle 9: Mittelwerte und Standardabweichungen von MEHP in Plasma allogener peripherer Stammzellspender/innen (n=10) vor Beginn der Lagerung und nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden bei -80°C.

| Plasma | | | | |
|---------------------------------|--|-----|-----|-----|
| | Lagerung in Stunden (h) bei -80°C | | | |
| | 0 | 24 | 48 | 72 |
| MEHP (µg/ml) Mittelwert | 2,7 | 3,3 | 4 | 2,8 |
| MEHP (µg/ml) Standardabweichung | 1,1 | 1,6 | 2,4 | 1,9 |

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte des Gehalts an MEHP im Plasma allogener peripherer Stammzellspender/innen, welches bei 4°C über einen Zeitraum von 72 Stunden gelagert wurde, wird in Tabelle 10 zusammengefasst. Die Messwerte steigen vom Zeitpunkt Null, d.h. vor Beginn der Lagerung, nach 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden statistisch signifikant an ($p < 0,05$, Student's t-Test).

Tabelle 10: Mittelwerte und Standardabweichungen von MEHP in Plasma allogener peripherer Stammzellspender/innen (n=10) vor Beginn der Lagerung und nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden bei 4°C

| Plasma | | | | |
|---------------------------------|--|------|------|------|
| | Lagerung in Stunden (h) bei 4°C | | | |
| | 0 | 24 | 48 | 72 |
| MEHP (µg/ml) Mittelwert | 2,7 | 20,3 | 33,5 | 49,5 |
| MEHP (µg/ml) Standardabweichung | 1,1 | 4,3 | 1 | 5,4 |

Bei einer Lagerungstemperatur von 37°C über 72 Stunden, wurde der Gehalt an MEHP im Plasma allogener peripherer Stammzellspender/innen vor Anfang der Lagerung und nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden ermittelt. Die

ermittelten Werte zeigen einen statistisch signifikanten Anstieg ($p < 0,05$, Student's t-Test).

Tabelle 11: Mittelwerte und Standardabweichungen von MEHP in Plasma allogener peripherer Stammzellspender/innen (n=10) vor Beginn der Lagerung und nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden bei 37°C

| Plasma | | | | |
|--|---|------|------|-------|
| | Lagerung in Stunden (h) bei 37°C | | | |
| | 0 | 24 | 48 | 72 |
| MEHP ($\mu\text{g/ml}$) Mittelwert | 2,7 | 77,5 | 98,1 | 105,1 |
| MEHP ($\mu\text{g/ml}$) Standardabweichung | 1,1 | 12,7 | 7,2 | 6,6 |

Die Abbildung 12 veranschaulicht graphisch die Mittelwerte und die Standardabweichungen des Gehalts an MEHP im Plasma allogener peripherer Stammzellspender/innen, welches über 72 Stunden bei -80°C, 4°C und 37°C gelagert wurde.

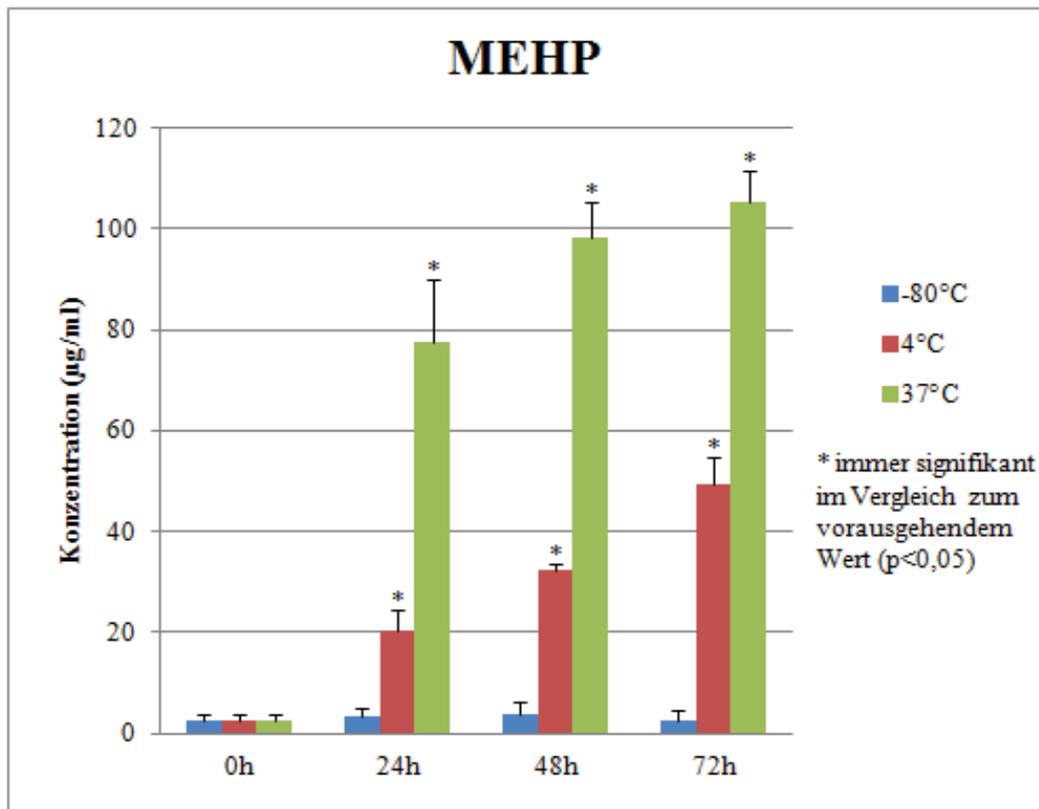


Abbildung 12: Mittelwerte und Standardabweichungen von MEHP in Plasma allogener peripherer Stammzellspender/innen (n=10) vor Beginn der Lagerung und nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden bei -80°C, 4°C und 37°C

Der Gehalt an DEHP im Plasma allogener peripherer Stammzellspender/innen während einer 72 stündigen Lagerung bei -80°C lag nach 24 Stunden, nach 48 Stunden und schließlich nach 72 Stunden unterhalb der Nachweisgrenze.

Weiterhin wurde der Gehalt an DEHP aus Plasma, welches von allogenen peripheren Stammzellspendern/innen gewonnen wurde untersucht, das bei 4°C 72 Stunden lang gelagert wurde. Die Untersuchungen erfolgten vor der Lagerung und nach einer Lagerung von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte zu den besagten Stunden sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Vergleicht man die Werte miteinander, so ist ein statistisch signifikanter Anstieg vom Zeitpunkt Null, d.h vor Beginn der Lagerung über 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden zu vermerken (p<0,05, Student's t-Test).

Tabelle 12: Mittelwerte und Standardabweichungen von DEHP in Plasma allogener peripherer Stammzellspender/innen (n=10) vor Beginn der Lagerung und nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden bei 4°C

| Plasma | | | | |
|---------------------------------|--|------|------|------|
| | Lagerung in Stunden (h) bei 4°C | | | |
| | 0 | 24 | 48 | 72 |
| DEHP (µg/ml) Mittelwert | 0 | 32,1 | 56,1 | 83,5 |
| DEHP (µg/ml) Standardabweichung | 0 | 3 | 12,9 | 35,2 |

Auch bei 37 °C wurde das von peripheren allogenen Stammzellspendern/innen gewonnene Plasma gelagert und auf den Gehalt von DEHP untersucht. Die erste Untersuchung erfolgte vor Beginn der 72 stündigen Lagerung bei 37°C. Die weiteren Untersuchungen wurden nach einer Lagerung von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden gemacht. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der ermittelten Ergebnisse sind der Tabelle 13 zu entnehmen. Der Gehalt an DEHP im Plasma allogener peripherer Stammzellspender/innen steigt bei 37°C vom Beginn der Lagerung bis zu einer Lagerungszeit von 72 Stunden statistisch signifikant an ($p < 0,05$, Student's t-Test).

Tabelle 13: Mittelwerte und Standardabweichungen von DEHP in Plasma allogener peripherer Stammzellspender/innen (n=10) vor Beginn der Lagerung und nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden bei 37°C

| Plasma | | | | |
|---------------------------------|---|------|------|-------|
| | Lagerung in Stunden (h) bei 37°C | | | |
| | 0 | 24 | 48 | 72 |
| DEHP (µg/ml) Mittelwert | 0 | 56,8 | 96,3 | 163,5 |
| DEHP (µg/ml) Standardabweichung | 0 | 8,2 | 25,3 | 76,9 |

Die oben erwähnten Mittelwerte und Standardabweichungen des Gehalts an DEHP im Plasma, welches von allogenen peripheren Stammzellspendern/innen gewonnen und bei 37°C über 72 Stunden gelagert wurde, sind in der Abbildung 13 graphisch dargestellt worden.

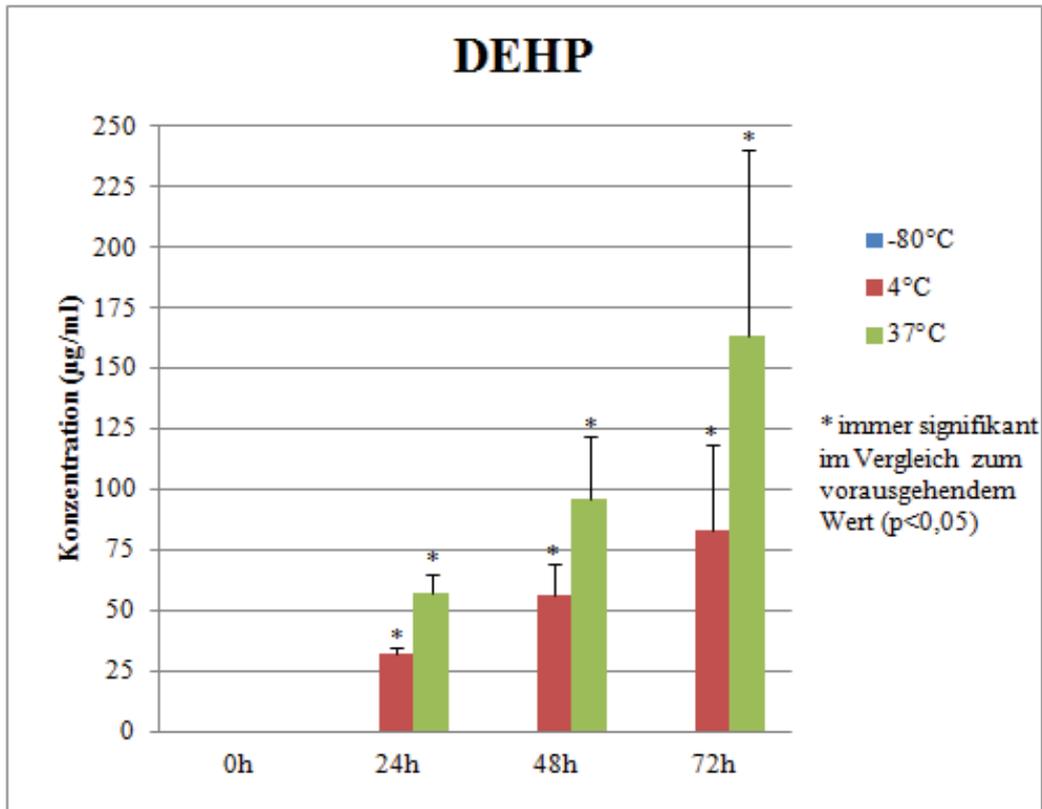


Abbildung 13: Mittelwerte und Standardabweichungen von DEHP in Plasma allogener peripherer Stammzellspender/innen (n=10) vor Beginn der Lagerung und nach einer Lagerung von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden bei -80°C, 4°C und 37°C

7. Lagerung von 0,9%igem Natriumchlorid bei 4°C, 37°C und -80°C über 72 Stunden

Im weiteren Verlauf wurde untersucht, welchen Einfluss unterschiedliche Temperaturen bei der Lagerung von 0,9%igem Natriumchlorid (NaCl) auf den Gehalt an den Phthalaten DEHP und MEHP hat. Dafür wurde 0,9%iges NaCl bei -80°C, 4°C und 37°C über 72 Stunden gelagert. Vor Beginn der Lagerung und in Abständen von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden wurde der Gehalt an DEHP und MEHP ermittelt. Dabei lag der Gehalt an DEHP und MEHP bei -80°C, 4°C und 37°C zu allen Messzeiten unterhalb der Nachweisgrenze.

8. Kontamination durch das Schlauchsystem

Zur Überprüfung, inwiefern das Schlauchsystem der Apheresegeräte während der Apherese die Phthalate DEHP und MEHP entlässt, wurde das Schlauchsystem nach einer Apherese nicht verworfen, sondern mit dem restlichen in ihm vorhandenen Spenderblut für 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Gleich nach Entnahme des Schlauchsystems aus der Maschine und nach einer Lagerung von 24 Stunden wurden Proben aus dem Schlauchsystem entnommen und die Menge an DEHP und MEHP bestimmt. Dabei ließ sich innerhalb von 24h Laufzeit ein Anstieg der durchschnittlichen MEHP- Konzentration von 0 µg/ml auf 5,39 µg/ml ± 5,85 nachweisen. Daraus lässt sich errechnen, dass insgesamt 0,22 µg/ml/h MEHP freigesetzt werden. Für das DEHP wurde ein Konzentrationsanstieg von 0 µg/ml auf 5,84 µg/ml ± 5,85 innerhalb von 24h ermittelt. Daraus ergibt sich eine DEHP Freisetzung von 0,22 µg/ml/h.

Im Weiteren wurde untersucht, wie hoch die Freisetzung an DEHP und MEHP pro Apherese für die allogenen und die autologen Stammzellspender/innen lag. Dafür wurde für beide Spendergruppen die durchschnittliche Laufzeit pro Apherese eruiert. Diese wurde aus den Spenderprotokollen herausgeschrieben. Die Laufzeiten der autologen Stammzellspenden ergaben im Durchschnitt 2,7 h ± 1,1. Die Laufzeiten der allogenen Stammzellspende betragen 3,2 h ± 0,7.

5. Diskussion

Im Folgenden wurden die erarbeiteten Ergebnisse interpretiert und mögliche Beziehungen untereinander versucht zu schließen. Dabei wurden die in der Zielsetzung genannten Fragen themenweise beantwortet.

Die Untersuchung des Gehalts an zellulären Bestandteilen vor und nach einer Apherese in dieser wissenschaftlichen Arbeit zeigte, dass eine Apherese wesentlichen Einfluss auf das Blutbild hatte. So konnten signifikant niedrigere Werte nach einer Apherese beobachtet werden, sowohl in der allogenen wie auch in der autologen Spendergruppe, da neben den gesammelten Stammzellen auch vereinzelt andere zelluläre Bestandteile entnommen wurden. Diese Tatsache berichteten auch Cherqaoui et al. in ihrer Studie von 2013.⁶⁵ Das et al. zeigten die Abnahme der zellulären Bestandteile während der Thrombozytenapherese in einer Studie von 2009.⁶⁶

Das Blutbild der autologen Gruppe zeigte im Vergleich zur allogenen Gruppe signifikant niedrigere Werte vor und nach der Apherese. Dies ist auf die diversen hämatopoetischen Systemerkrankungen der autologen Gruppe zurückzuführen, die durch ein fehlendes intaktes Knochenmark eine autologe Stammzellapherese erforderlich machten.^{67 57} Die allogene Spendergruppe zeigte vor und nach der Apherese auffällig hohe Leukozytenkonzentrationen, die jedoch auf die Gabe von G-CSF (engl. Granulocyte- Colony Stimulating Factor) vor der Apherese zurückzuführen sind.

Als nächstes wurde untersucht, ob die periphere Stammzellapherese eine erhöhte Exposition an DEHP und MEHP förderte. In dieser Studie konnte beobachtet werden, dass das Schlauchsystem der Apheresemaschine für das DEHP und für das MEHP eine Freisetzung von 0,22 µg/ml/min ergab. Somit waren Konzentrationen an DEHP und MEHP im Apheresat der autologen und auch in der allogenen Spendergruppe nachweisbar. Allerdings konnte im Apheresat der allogenen Spender signifikant höhere Konzentrationen an DEHP und MEHP gezeigt werden. Diese Tatsache ließ sich durch die signifikant längere Laufzeit der Apherese bei den allogenen Spendern/innen erklären. Diese hatte eine mittlere Laufzeit von $3,2 \pm 0,7$ Stunden verglichen mit der mittleren Laufzeit der autologen Spender/innen, die $2,7 \pm 1,1$ Stunden betraf. Somit war das prozessierte Blutvolumen länger dem Schlauchsystem ausgesetzt. Eine weitere mögliche Erklärung, die in dieser Arbeit leider nicht untersucht wurde, könnte eine

Betrachtung der Triglyzeridkonzentration im Serum der Spender/innen liefern. Da das DEHP lipidlöslich ist, würden erhöhte Konzentrationen an Triglyzeridkonzentration im Serum das Herauslösen des DEHP womöglich fördern und somit die unterschiedlichen Konzentrationen der Weichmacher in den Apheresaten der zwei Spendergruppen erklären.^{2 68 35 12 14}

Die Konzentrationen an DEHP und MEHP aus dem peripheren Blut war vor der Apherese für die allogenen Spender/innen der peripheren Stammzellapherese nicht nachweisbar und auch nach der Apherese waren die Konzentrationen nicht signifikant angestiegen. In Anbetracht der langen Laufzeiten und der geschätzten DEHP-Freisetzung aus dem Schlauchsystem von 0,22 µg/ ml/ h hätte man mit erhöhten Konzentrationen rechnen können. Als mögliche Erklärung wäre aber zu nennen, dass das DEHP durch Plasma- und Leberenzyme schnell zu seinen Abbauprodukten umgewandelt wurde und es somit nur noch in kleinen Konzentrationen nachweisbar war im Blut. Eine weitere Erklärung wäre, dass das DEHP in verschiedenen Organen akkumulierte und deswegen nur noch spärlich nachweisbar war.^{37, 68} Die Autologen Spender/innen zeigten vor und nach der Apherese keine nachweislichen Konzentrationen an MEHP im peripheren Blut, da das MEHP wahrscheinlich bereits in seine Abbauprodukte umgewandelt wurde. Die Konzentration an DEHP im peripheren Blut war vor der Apherese bereits nachweisbar und ist nach der Apherese statistisch signifikant angestiegen. Tickner et al schrieben dazu in einer Studie im Jahr 2001, dass chronisch kranke Menschen generell erhöhte Konzentrationen an DEHP vorwiesen

Das Knochenmarkpräparat allogener Spender/innen enthielt ebenfalls nachweisbare Konzentrationen an DEHP und MEHP. Verglichen mit den Apheresaten der allogenen Stammzellspender/innen waren wie auch zu erwarten war, die Konzentrationen jedoch signifikant niedriger. Zu beachten ist, dass die Knochenmarkentnahme am Beckenkamm durchschnittlich zwei Stunden dauert und somit kürzer ist, als die periphere Stammzellapherese. Es erfolgt auch keine Kontamination mit den Weichmachern durch das Schlauchsystem, wie es bei der peripheren Stammzellapherese der Fall ist. Um aber dennoch eine mögliche Erklärung für die nachweisbaren Konzentrationen an DEHP und MEHP zu liefern, seien zum einen die benutzten Instrumentarien zu nennen, die während der Knochenmarkentnahme verwendet wurden und ein PVC- haltiges Phthalatgemisch waren. So zum Beispiel das

Schlauchsystem zur Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose, Spritzen und weitere Materialien.^{69 34 44}

Die Frage nach dem Einfluss der Lagerungszeit und der Lagerungstemperatur auf die Konzentrationen an DEHP und MEHP in den unterschiedlichen Präparaten (Knochenmark, Apheresat, Plasma, Gemisch aus Plasma und Apheresat) ließ sich durch die durchgeführten Untersuchungen gut beantworten. So konnte veranschaulicht werden, dass die Dauer der Lagerung einen signifikanten Anstieg der Konzentrationen an DEHP und MEHP verursachte.^{23, 29, 37, 50} Auch die Lagerungstemperatur beeinflusste den Gehalt an DEHP und MEHP. So konnten die Ergebnisse der Plasmalagerung bei 4°C, 37°C und -80°C zeigen, dass eine erhöhte Temperatur auch eine erhöhte Freisetzung der Phthalate DEHP und MEHP bedeutet.⁷⁰ In der Literatur konnte damit Einigkeit erzielt werden. Cole et al. berichten in einer Studie von 1981, dass die enzymatische Aktivität im Plasma, die DEHP in MEHP umwandelt, bei höheren Temperaturen größer sei. Daher sei eine Schutzmaßnahme, die Kontamination mit DEHP und MEHP zu umgehen, frisches Plasma direkt einzufrieren.^{2 23}

Im Weiteren wurden der Fragen nachgegangen, ob zellulärer Bestandteile sich von nicht zellulären Bestandteilen im Herauslösen von Phthalaten aus den Lagerungsbeuteln über die Zeit unterscheiden. Diese Studie konnte die in der Literatur geforderten Erfahrungen bezüglich dieser Frage ergänzen. Tickner et al. beschrieben in ihrer Studie aus dem Jahr 2001, dass das DEHP durch Blutprodukte aus dem PVC- haltigem Material gelöst wird, da es selber lipophil sei. In einer weiteren Literatur von Inoue et al. wird behauptet, dass das DEHP nicht chemisch gebunden sei am PVC- Polymer und somit von Blutprodukten aus dem PVC gelöst wird. Er beschrieb weiterhin in seiner Studie, dass die größte Freisetzung aus PVC- haltigen Beuteln und damit die höchste Konzentration an DEHP in Vollblut gefunden wurde. Die größte Hydrolyse, das Verhältnis von DEHP zu MEHP, sei im Plasma am größten. Als Begründung lieferte er die unterschiedliche Lipidzusammensetzung im Vollblut und Plasma.^{37 50 2}

In dieser Studie konnte beobachtet werden, dass die höchste Konzentration an DEHP nach einer Lagerungszeit von 72 Stunden im Apheresat vorzufinden war, wohingegen die größte Konzentration an MEHP im reinen Plasma vorkam. Das DEHP bindet sich an die zellulären Bestandteile des Blutes.⁵⁶ Das erklärte die erhöhte Konzentration an DEHP im Apheresat und die enzymatische Aktivität, die DEHP zu MEHP umwandelte,

war im Plasma am höchsten. Das Verhältnis von DEHP zu MEHP war in reinem Plasma während der gesamten Lagerung am geringsten. Damit schließt sich diese Studie der Literatur an.

In einem weiteren Versuch innerhalb dieser Studie konnten gezeigt werden, dass reines 0,9%iges Natriumchlorid (NaCl), das für 72 Stunden bei 4°C gelagert wurde, das Herauslösen von DEHP aus dem PVC nicht begünstigte. Es waren während der gesamten Lagerungszeit keine Konzentrationen an DEHP und MEHP nachweisbar. Diese Ergebnisse bestätigten die Aussage, dass das DEHP wasserunlöslich sei und sein Herauslösen letztlich durch lipidhaltige Lösungen/ Substanzen provoziert wurde.^{48 13 12}

Abschließend hatte sich diese Studie mit der Spendersicherheit beschäftigt. Es wurde der Frage nachgegangen, ob Spender/innen der peripheren Stammzellapherese und Spender/innen, die sich einer invasiven Knochenmarkentnahme unterzogen haben, Konzentrationen an DEHP und MEHP erreichten, die noch unterhalb des TDI (engl.: tolerable daily intake) lagen. Desweiteren sollte beurteilt werden, ob sich Empfänger der Apheresate und der Knochenmarkpräparate durch die Transplantation erhöhten DEHP und MEHP Konzentrationen aussetzten. Der TDI Wert für das DEHP liegt der unterschiedlichen Literatur nach zwischen 37- 48 µg/kg KG/Tag.^{4 5 2} Für das MEHP liegt der TDI Wert nach Koch et al bei 37 µg/kg KG/Tag.⁴ In Bezug auf die eruierten Laufzeiten der autologen und allogenen Stammzellspender/innen und die durch das Schlauchsystem freiwerdenden Mengen an DEHP und MEHP ergaben sich folgende Werte: Die allogenen Stammzellspender/innen erhielten einen geschätzten Gehalt an DEHP und MEHP von jeweils 3574,9 µg ± 782µg pro Apherese. Die autologen Spender/innen erhielten pro Apherese einen geschätzten Gehalt an DEHP und MEHP von jeweils 2988,4 µg ± 1217,5 µg. Die ermittelten Werte wurden anschließend auf das mittlere Körpergewicht der beiden Spendergruppen bezogen, um schließlich einen Aussage machen zu können, in welchem Zusammenhang der ermittelte Wert zum TDI steht. Das mittlere Körpergewicht der allogenen Spender/innen betrug 81,4 kg und das der autologen Gruppen 80,3 kg. Daraus ergab sich für die allogenen Spender/innen eine geschätzte Aufnahme an DEHP und MEHP von jeweils 43,9 µg/ kg KG ± 9,6 µg/ kg KG. Für die autologen Spender/innen ergab sich eine geschätzte Aufnahme an DEHP und MEHP von jeweils 37,2 µg/ kg KG ± 15,2 µg/ kg KG. Evident wurde, dass in dieser Studie, der TDI für das DEHP und für das MEHP für die Spender/innen einer allogenen peripheren Stammzellapherese nicht überschritten haben. Auch die autologen

Spender/innen der peripheren Stammzellapherese erreichten durch die Apherese den TDI für das DEHP nicht. Die Schlussfolgerung war, dass eine Spendersicherheit in Bezug auf eine mögliche Gefährdung durch die Phthalate DEHP und MEHP gewährleistet wurde. Entgegen dieser Schlussfolgerung konnten Koch et al. in einer ihrer Studien aus dem Jahr 2006 beweisen, dass eine Thrombozytenspende zu DEHP Werten von 38 µg/ kg KG/ Tag führt, was für eine 65 kg schwere Person bedeutet, dass sie 2,5 mg DEHP pro Thrombozytenspende aufnehmen und damit den TDI überschreitet.⁸ Buchta et al. hingegen publizierten in einer Studie von 2003, dass eine Thrombozytenspende eine DEHP Kontamination von 6,5 µg/ kg KG verursacht. Dies würde einem Wert entsprechen, der noch unterhalb des TDI Wertes läge und somit keine Gefährdung für die Spende/innen bedeuten würde.⁶⁸ Auch Sampson et al bestätigen in ihrer Studie, dass weder eine Thrombozytenspende noch eine Plasmaspende DEHP Kontaminationen für die Spender/innen verursachen, die den TDI übersteigen.²

Im Weiteren sollte beurteilt werden, inwieweit die Empfänger der Apheresate erhöhten Konzentrationen an DEHP und MEHP ausgesetzt waren und ob diese noch innerhalb des TDI waren.

Zunächst einmal sollte geprüft werden, ob die in dieser Studie ermittelten Konzentrationen an DEHP in einem Apheresat einer autologen Stammzellapherese, welches im Durchschnitt 47 Tage bei -175°C gelagert wurde den TDI überschritten haben. Es war davon ausgegangen, dass das Volumen eines Apheresats im Durchschnitt 162 ml betraf. Daraus konnte eine gesamt Konzentration an DEHP pro Apheresat von 1145 µg ± 897 µg geschlussfolgert werden. Für die autologen Stammzellspender/innen, deren mittleres Körpergewicht bei 78 kg lag, betrug der geschätzte TDI im Mittel 3318 µg/ Tag. Somit lag die gesamte Konzentration an DEHP im Apheresat unterhalb des TDI. Hier wurde die reine Konzentration aus dem Apheresat gewertet und die durch das Transfusionsbesteck während der Transfusion möglichen anfallenden DEHP Konzentrationen vernachlässigt.

Im Anschluss sollte geprüft werden, ob die Empfänger der allogenen peripheren Stammzellapheresate durch die Transplantation des Apheresats DEHP Konzentrationen ausgesetzt waren, die den TDI überschritten. Das durchschnittliche Volumen der Apheresate in dieser Studie betrug 179 ml. Da der genaue Zeitpunkt der Transfusion

leider nicht ermittelt werden konnte, da die Apheresate auch außerhalb Deutschlands transfundiert wurden, ist es nicht möglich, eine Aussage diesbezüglich zu machen. Wenn man allerdings von einer 24 stündigen Lagerung bei 4°C ausgegangen wäre, so hätte man laut dieser Studie von geschätzten Konzentrationen an DEHP von 100 µg/ml ausgehen können. Dies würde für ein Apheresat einen geschätzten Wert von 17900 µg ergeben. Somit wäre der TDI mit einem allogenen Apheresat überschritten worden. In der Literatur wurden ähnliche Sachlagen beschrieben. So beschrieben Inoue et al. in einer Studie aus dem Jahr 2005 folgende Konzentrationen an DEHP: Für ein Erythrozytenkonzentrat 6,8- 36,5 µg/ml, für ein gefrorenes Plasma 11,6- 18,5 µg/ml, für ein Thrombozytenkonzentrat 1,8- 15 µg/ml und für Vollblut 15- 83,2 µg/ml.⁵⁰ Somit würde jede Transfusion eine Überschreitung des TDI bedeuten. Auch Sampson berichtet von DEHP Konzentrationen in Thrombozytenkonzentraten, die für 7 Tage bei 22°C gelagert wurden und in Erythrozytenkonzentraten, die für 35 Tage bei 4°C gelagert wurden. In beiden Konzentraten wäre die DEHP Konzentration für eine Transfusion so hoch, dass der TDI überschritten wäre.² Rock et al schrieben in einer Studie aus dem Jahr 1986, dass aus den bei 4°C gelagerten Blutbeuteln, welche mit Vollblut gefüllt waren, die DEHP- Freisetzung 0,25 mg/ 100 ml/ Tag betrug. Auch hier wäre nach einer Lagerung über drei Wochen mit einer DEHP Kontamination von bis zu 5mg/ 100ml zu rechnen. Das wären schätzungsweise 15 mg DEHP für einen Vollblutbeutel.⁷⁰ Diese Studie deckt sich mit den Ergebnissen dieser Studie. Schaute man sich in Anbetracht der zitierten Literatur, noch einmal die Werte dieser Studie an, so ließ sich vermuten, dass die autologen Spender/innen der peripheren Stammzellapherese mit der Transfusion ihres Apheresats den TDI nicht überschritten haben, weil das Apheresat ein relativ niedriges Volumen in Vergleich zu den zitierten Blutprodukten aufwies. Die Empfänger der Apheresate der allogenen peripheren Stammzellapherese hätten womöglich ihr TDI überschritten, obwohl das Volumen nicht signifikant höher war als das der autologen Spender/innen. Der Grund hätte mit großer Wahrscheinlichkeit an der Lagerung bei 4°C über 24 Stunden gelegen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass während der periphere Stammzellapherese das Phthalat DEHP aus dem Schlauchsystem, welches aus PVC- haltiges Phthalatgemisch bestand, herausgelöst wurde. Das Herauslösen führte bei den Spender/innen zu einer erhöhten Kontamination an DEHP und seinem primären Abbauprodukt MEHP. Die Konzentration lag jedoch noch unterhalb des TDI und war somit noch zu tolerieren.

Angesichts der Lagerung konnte geschlussfolgert werden, dass die Lagerzeit einen Einfluss auf die Konzentration an DEHP und MEHP hatte. Die Freisetzung des DEHP korrelierte direkt mit der Temperatur.

Als Fazit sollte gesagt werden, dass die Kontamination mit DEHP durch eine Transfusion mit Blutprodukten minimiert werden kann, indem Produkte mit einer möglichst kurzen Lagerungszeit bevorzugt verwendet werden. Auch sollte versucht werden, Blutbeutel zu verwenden, die keine Phthalate beinhalten, sofern dies keine Nachteile für die gelagerten Substanzen mit sich bringt. Für die Spender/innen einer peripheren Stammzellapherese hätte es in Anbetracht der langen Laufzeiten durchaus positive Effekte, wenn das Schlauchsystem frei an DEHP wäre.

6. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Blount BC, Silva MJ, Caudill SP, et al. Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. *Environ Health Perspect* 2000;108:979-82.
2. Sampson J, de Korte D. DEHP-plasticised PVC: relevance to blood services. *Transfus Med* 2011;21:73-83.
3. Hildenbrand SL, Lehmann HD, Wodarz R, Ziemer G, Wendel HP. PVC-plasticizer DEHP in medical products: do thin coatings really reduce DEHP leaching into blood? *Perfusion* 2005;20:351-7.
4. Koch HM, Drexler H, Angerer J. An estimation of the daily intake of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population. *Int J Hyg Environ Health* 2003;206:77-83.
5. Koch HM, Rossbach B, Drexler H, Angerer J. Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates--determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. *Environ Res* 2003;93:177-85.
6. Lyche JL, Gutleb AC, Bergman A, et al. Reproductive and developmental toxicity of phthalates. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2009;12:225-49.
7. Anderson D, Yu TW, Hincal F. Effect of some phthalate esters in human cells in the comet assay. *Teratog Carcinog Mutagen* 1999;19:275-80.
8. Koch HM, Preuss R, Angerer J. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure-- an update and latest results. *Int J Androl* 2006;29:155-65; discussion 81-5.
9. Inoue K, Kawaguchi M, Okada F, Yoshimura Y, Nakazawa H. Column-switching high-performance liquid chromatography electrospray mass spectrometry coupled with on-line of extraction for the determination of mono- and di-(2-ethylhexyl) phthalate in blood samples. *Anal Bioanal Chem* 2003;375:527-33.
10. Albro PW, Lavenhar SR. Metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate. *Drug Metab Rev* 1989;21:13-34.
11. Chiu NM, Chun T, Fay M, Mandal M, Wang CR. The majority of H2-M3 is retained intracellularly in a peptide-receptive state and traffics to the cell surface in the presence of N-formylated peptides. *J Exp Med* 1999;190:423-34.
12. Myhre BA. Toxicological quandary of the use of bis (2-diethylhexyl) phthalate (DEHP) as a plasticizer for blood bags. *Ann Clin Lab Sci* 1988;18:131-40.
13. Posnack NG, Lee NH, Brown R, Sarvazyan N. Gene expression profiling of DEHP-treated cardiomyocytes reveals potential causes of phthalate arrhythmogenicity. *Toxicology* 2011;279:54-64.

14. Simmchen J, Ventura R, Segura J. Progress in the removal of di-[2-ethylhexyl]-phthalate as plasticizer in blood bags. *Transfus Med Rev* 2012;26:27-37.
15. Cousins I, Mackay D. Correlating the physical-chemical properties of phthalate esters using the 'three solubility' approach. *Chemosphere* 2000;41:1389-99.
16. Koch HM, Drexler H, Angerer J. Internal exposure of nursery-school children and their parents and teachers to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). *Int J Hyg Environ Health* 2004;207:15-22.
17. Lucas BE, Fields C, Joshi N, Hofmann MC. Mono-(2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) affects ERK-dependent GDNF signalling in mouse stem-progenitor spermatogonia. *Toxicology* 2012;299:10-9.
18. Gourlay T, Shedden L, Horne D, Stefanou DM. Simple surface sulfonation retards plasticiser migration and impacts upon blood/material contact activation processes. *Perfusion* 2010;25:31-9.
19. Seidl S, Gosda W, Reppucci AJ. The in vitro and in vivo evaluation of whole blood and red cell concentrates drawn on CPDA-1 and stored in a non-DEHP plasticized PVC container. *Vox Sang* 1991;61:8-13.
20. Peck CC, Odom DG, Albro PW, Jess DA, Barrett BB. Effect of heat on the conversion of di-2-ethylhexyl phthalate to mono-2-ethylhexyl phthalate in human plasma. *Transfusion* 1981;21:163-6.
21. Carmen R. The selection of plastic materials for blood bags. *Transfus Med Rev* 1993;7:1-10.
22. Estep TN, Pedersen RA, Miller TJ, Stupar KR. Characterization of erythrocyte quality during the refrigerated storage of whole blood containing di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Blood* 1984;64:1270-6.
23. Cole RS, Tocchi M, Wye E, Villeneuve DC, Rock G. Contamination of commercial blood products by di-2-ethylhexyl phthalate and mono-2-ethylhexyl phthalate. *Vox Sang* 1981;40:317-22.
24. Segura J, Ventura R, Pascual JA. Current strategic approaches for the detection of blood doping practices. *Forensic Sci Int* 2011;213:42-8.
25. Solymos E, Guddat S, Geyer H, et al. Rapid determination of urinary di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites based on liquid chromatography/tandem mass spectrometry as a marker for blood transfusion in sports drug testing. *Anal Bioanal Chem* 2011;401:517-28.
26. Shea KM. Pediatric exposure and potential toxicity of phthalate plasticizers. *Pediatrics* 2003;111:1467-74.
27. Schmid P, Schlatter C. Excretion and metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate in man. *Xenobiotica* 1985;15:251-6.

28. Shintani H. Determination of phthalic acid, mono-(2-ethylhexyl) phthalate and di-(2-ethylhexyl) phthalate in human plasma and in blood products. *J Chromatogr* 1985;337:279-90.
29. Sjoberg PO, Bondesson UG, Sedin EG, Gustafsson JP. Exposure of newborn infants to plasticizers. Plasma levels of di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate during exchange transfusion. *Transfusion* 1985;25:424-8.
30. Koch HM, Bolt HM, Preuss R, Angerer J. New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol* 2005;79:367-76.
31. Koch HM, Gonzalez-Reche LM, Angerer J. On-line clean-up by multidimensional liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for high throughput quantification of primary and secondary phthalate metabolites in human urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;784:169-82.
32. Koo HJ, Lee BM. Toxicokinetic relationship between di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *J Toxicol Environ Health A* 2007;70:383-7.
33. Herr C, zur Nieden A, Koch HM, et al. Urinary di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)--metabolites and male human markers of reproductive function. *Int J Hyg Environ Health* 2009;212:648-53.
34. Doull J, Cattley R, Elcombe C, et al. A cancer risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate: application of the new U.S. EPA Risk Assessment Guidelines. *Regul Toxicol Pharmacol* 1999;29:327-57.
35. Fay M, Donohue JM, De Rosa C. ATSDR evaluation of health effects of chemicals. VI. Di(2-ethylhexyl)phthalate. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *Toxicol Ind Health* 1999;15:651-746.
36. Dumont LJ, Baker S, Dumont DF, et al. Exploratory in vitro study of red blood cell storage containers formulated with an alternative plasticizer. *Transfusion* 2012;52:1439-45.
37. Tickner JA, Schettler T, Guidotti T, McCally M, Rossi M. Health risks posed by use of Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: a critical review. *Am J Ind Med* 2001;39:100-11.
38. Becker K, Seiwert M, Angerer J, et al. DEHP metabolites in urine of children and DEHP in house dust. *Int J Hyg Environ Health* 2004;207:409-17.
39. Gray LE, Jr., Wolf C, Lambright C, et al. Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. *Toxicol Ind Health* 1999;15:94-118.

40. Kavlock R, Boekelheide K, Chapin R, et al. NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Reprod Toxicol* 2002;16:529-653.
41. Gray TJ, Gangolli SD. Aspects of the testicular toxicity of phthalate esters. *Environ Health Perspect* 1986;65:229-35.
42. Li LH, Jester WF, Jr., Orth JM. Effects of relatively low levels of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on cocultured Sertoli cells and gonocytes from neonatal rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;153:258-65.
43. Martino-Andrade AJ, Chahoud I. Reproductive toxicity of phthalate esters. *Mol Nutr Food Res* 2010;54:148-57.
44. Lovekamp-Swan T, Davis BJ. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ Health Perspect* 2003;111:139-45.
45. Gray TJ, Rowland IR, Foster PM, Gangolli SD. Species differences in the testicular toxicity of phthalate esters. *Toxicol Lett* 1982;11:141-7.
46. Wei Z, Song L, Wei J, et al. Maternal exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate alters kidney development through the renin-angiotensin system in offspring. *Toxicol Lett* 2012;212:212-21.
47. Sheffield WP, Bhakta V, Mastronardi C, Ramirez-Arcos S, Howe D, Jenkins C. Changes in coagulation factor activity and content of di(2-ethylhexyl)phthalate in frozen plasma units during refrigerated storage for up to five days after thawing. *Transfusion* 2012;52:493-502.
48. Rubin RJ, Ness PM. What price progress? An update on vinyl plastic bags. *Transfusion* 1989;29:358-61.
49. Koch HM, Angerer J, Drexler H, Eckstein R, Weisbach V. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) exposure of voluntary plasma and platelet donors. *Int J Hyg Environ Health* 2005;208:489-98.
50. Inoue K, Kawaguchi M, Yamanaka R, et al. Evaluation and analysis of exposure levels of di(2-ethylhexyl) phthalate from blood bags. *Clin Chim Acta* 2005;358:159-66.
51. Erkekoglu P, Rachidi W, Yuzugullu OG, et al. Evaluation of cytotoxicity and oxidative DNA damaging effects of di(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) on MA-10 Leydig cells and protection by selenium. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;248:52-62.
52. Gupta RK, Singh JM, Leslie TC, Meachum S, Flaws JA, Yao HH. Di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate inhibit growth and reduce estradiol levels of antral follicles in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;242:224-30.

53. Wahl HG, Hong Q, Hildenbrand S, Risler T, Luft D, Liebich H. 4-Heptanone is a metabolite of the plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:2576-83.
54. Kearns GL, Abdel-Rahman SM, Alander SW, Blowey DL, Leeder JS, Kauffman RE. Developmental pharmacology--drug disposition, action, and therapy in infants and children. *N Engl J Med* 2003;349:1157-67.
55. Greiner TO, Volkmann AS, Hildenbrand S, et al. DEHP and its active metabolites: leaching from different tubing types, impact on proinflammatory cytokines and adhesion molecule expression. Is there a subsumable context? *Perfusion* 2012;27:21-9.
56. Labow RS, Card RT, Rock G. The effect of the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate on red cell deformability. *Blood* 1987;70:319-23.
57. Link H, Kolb HJ, Ebell W, et al. [Transplantation of hematopoietic stem cells. I: Definitions, principle indications, complications]. *Med Klin (Munich)* 1997;92:480-91, 505.
58. Berenson RJ, Andrews RG, Bensinger WI, et al. Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J Clin Invest* 1988;81:951-5.
59. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Physiol* 1963;62:327-36.
60. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004;116:639-48.
61. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000;100:157-68.
62. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996;87:1-13.
63. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 1984;133:157-65.
64. Drenou B. Flow cytometry for CD34 determination in hematopoietic grafts. *Hematol Cell Ther* 1996;38:505-12.
65. Cherqaoui B, Rouel N, Auvrignon A, et al. Peripheral blood stem cell collection in low-weight children: retrospective comparison of two apheresis devices. *Transfusion* 2013.
66. Das SS, Chaudhary R, Verma SK, Ojha S, Khetan D. Pre- and post- donation haematological values in healthy donors undergoing plateletpheresis with five different systems. *Blood Transfus* 2009;7:188-92.

67. Link H, Kolb HJ, Ebell W, et al. [Transplantation of hematopoietic stem cells. II: Indications for transplantation of hematopoietic stem cells after myeloablative therapy]. *Med Klin (Munich)* 1997;92:534-45.
68. Buchta C, Bittner C, Hocker P, et al. Donor exposure to the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate during plateletpheresis. *Transfusion* 2003;43:1115-20.
69. Pulsipher MA, Chitphakdithai P, Logan BR, et al. Acute toxicities of unrelated bone marrow versus peripheral blood stem cell donation: results of a prospective trial from the National Marrow Donor Program. *Blood* 2013;121:197-206.
70. Rock G, Labow RS, Tocchi M. Distribution of di(2-ethylhexyl) phthalate and products in blood and blood components. *Environ Health Perspect* 1986;65:309-16.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein größter Dank gebührt Prof. Dr. Dr. G. Giers für die freundliche Überlassung des Themas dieser Dissertation. Außerdem danke ich Ihm, dass er jeder Zeit für mich erreichbar war und stets geduldig, gutgesinnt und unermüdbar ein offenes Ohr für wissenschaftliche Fragen hatte. Ich danke Ihm für die grandiose Zusammenarbeit und die wertvolle Hilfsbereitschaft.

Desweiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Wenzel für die engagierte, vorbildliche und intensive Betreuung dieser Arbeit bedanken. Er stand mir mit wertvollen Anregungen während des gesamten Entstehungsprozesses zur Seite und hat mit persönlichem Interesse am Erfolg dieser Dissertation ganz wesentlich beigetragen.

Ein großer Dank gilt dem Team des Zentrums für präventive Dopingforschung am Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln, für die Möglichkeit der Nutzung der Labore Geräte und Materialien für die Auswertung der gesammelten Proben. Insbesondere möchte ich in diesem Zusammenhang Oliver Krug danken für die jederzeit gewährte fachliche Unterstützung und die Hilfe bei der zeitaufwendigen Messung der Proben.

Außerdem danke ich Clarissa Mantsch, Barbara Freudenberg und Sabina Bleser für die wertvolle und freundliche Hilfe bei der Beschaffung und Bearbeitung der Proben und das sehr angenehme Arbeitsklima.

Ich möchte mich von Herzen bei meiner Mutter bedanken, die mir das Studium der Humanmedizin überhaupt ermöglicht hat und mich die ganze Zeit liebevoll, geduldig und motivierend unterstützt hat. Ein großer Dank gilt auch meiner Schwester für Ihre Unterstützung und konstruktive Kritik.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinem besten Freund Thomas Kampa, der mich mit seiner überwältigenden Hilfsbereitschaft und fachlichen Kompetenz im statistischen und graphischen Teil dieser Arbeit tatkräftig unterstützt hat.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum: 22.03.2014

Unterschrift