

*Aus der Abteilung für Hämatologie an der I. Medizinischen Universitätsklinik
und dem
Institut für Hämatologie der GSF, Assoziation mit Euratom, München
(Vorstand: Prof. Dr. W. Stich)
und der
Medizinischen Klinik der Universität Innsbruck
(Vorstand: Prof. Dr. H. Braunsteiner)*

Verkürzung der Lebensdauer DF³²P-markierter Granulozyten nach Isolierung mit Dextran oder Ammoniumchlorid*

Von H. Bolland, H. Pfisterer, W. Ruppelt und G. Michlmayr

Bei der Behandlung von Patienten mit zellulärer Abwehrschwäche stellt die Transfusion von Granulozyten möglicherweise einen Fortschritt dar. Bisher wurden nur Leukozyten von chronisch myeloischen Leukämien verwendet [3,5]. Anzustreben ist jedoch die Übertragung von Zellen aus Normalpersonen. Um zur Transfusion geeignete Konzentrate zu erhalten, ist deshalb eine Anreicherung unumgänglich. Dazu werden vor allem Methoden verwendet, in denen die Erythrozyten größtenteils durch Sedimentation oder Hämolyse beseitigt werden. Ein optimaler Transfusionserfolg ist jedoch nur dann zu erwarten, wenn die Zellen durch das Anreicherungsverfahren nicht geschädigt werden. Eine der empfindlichsten Prüfungen der Zellschädigung ist die Ermittlung der Lebensdauer der Granulozyten.

In der vorliegenden Arbeit haben wir deshalb Lebensdauerbestimmungen autolog transfundierter Granulozyten in vivo durchgeführt, die entweder durch Sedimentation mit Dextran oder durch Hämolyse der Erythrozyten mit Ammoniumchlorid angereichert wurden. Die Ergebnisse haben wir mit der Lebensdauer von Granulozyten verglichen, die in Vollblut in vitro markiert worden waren. Als Markierungssubstanz diente ³²P-markiertes Diisopropylfluorophosphat (DF³²P).

Methodik

Unsere Untersuchungen wurden an insgesamt 14 Normalpersonen durchgeführt. Bei 5 Personen erfolgte die Anreicherung der Granulozyten vor der Markierung durch Sedimentation der Erythrozyten mit Dextran, in 5 weiteren Fällen durch Hämolyse mit NH₄Cl. Bei den 4 Kontrollbestimmungen wurden die Granulozyten in Vollblut in vitro markiert. Die Anreicherung der Granulozyten, ihre Markierung mit DF³²P und die Bestimmung der Granulozytenaktivitäten bei den Blutentnahmen p. i. wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt. Es wurden ausschließlich Blutbeutel der Fa. Fenwal** verwendet.

* Studie im Rahmen des Assoziationsvertrages Hämatologie, GSF-EURATOM No. 031-64-I BIAD und des Sonderforschungsbereiches 37 der Universität München.

** Blutbeutel: PVC-Plastikbeutel der Fa. Fenwal Laboratories.

Eingegangen am 10. 11. 1970.

I. Blutentnahme und Anreicherung der Granulozyten

In allen Fällen erfolgte die Entnahme von 450 ml Blut in 600 ml Blutbeutel, die als Antikoagulans 50 ml ACD* enthielten. Bei den vier Kontrollbestimmungen wurde das ACD-Vollblut ohne weitere Isolierungsverfahren radioaktiv markiert. Bei den anderen Fällen wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. Sedimentation mit Dextran: In fünf Fällen wurden die Erythrozyten zum größten Teil mit Dextran** absedimentiert. Hierbei wurde die bereits früher beschriebene Methode [7] angewendet:
 - a) In zwei 600-ml-Beutel wurden je 250 ml ACD-Blut mit 125 ml Dextran versetzt (Blut/Dextran 2 : 1) und zur Sedimentation der Erythrozyten eine halbe Stunde stehen gelassen.
 - b) Der leukozytenreiche Überstand beider Beutel wurde in einen weiteren 600-ml-Beutel abgepreßt und bei 300 g 15 Min. zentrifugiert.
 - c) Der Überstand des Zentrifugats wurde fast vollständig abgepreßt, 10 ml davon aufbewahrt und der Rest verworfen. Das leukozytenreiche Sediment wurde im restlichen Überstand resuspendiert und zur Markierung bereitgestellt.
2. Hämolyse durch Ammoniumchlorid: In den übrigen fünf Fällen entfernten wir die Erythrozyten durch Hämolyse mit NH₄Cl analog der Arbeit von Agostoni [1].
 - a) Zu diesem Zweck wurde das ACD-Blut zu je 110 ml in vier 600 ml Blutbeutel aufgeteilt, mit der 4fachen Menge von 0,83proz. NH₄Cl vermischt und 10 Min. stehen gelassen.
 - b) Danach wurde bei 300 g 15 Min. zentrifugiert, der Überstand nahezu vollständig abgepreßt und verworfen.
 - c) Das Leukozytensediment wurde in allen vier Beuteln im verbliebenen Überstand resuspendiert und dann in einem der Beutel zur Markierung bereitgestellt.
 - d) Die verbliebenen 60 ml ACD-Blut wurden zur Gewinnung von 20 ml Plasma bei 1000 g zentrifugiert.

II. Markierung des Vollblutes und der Leukozytenkonzentrate mit DF³²P

Sowohl das ACD-Vollblut als auch die Leukozytenkonzentrate wurden 60 Min. mit 100 µCi DF³²P*** inkubiert. Während das Vollblut sofort nach Markierung retransfundiert wurde, wurde bei den Leukozytenkonzentraten die nicht zellgebundene Aktivität einmal ausgewaschen: Die Beutel mit den Leukozytenkonzentraten wurden mit physiol. Kochsalz-Lösung aufgefüllt und 15 Min. bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgepreßt und verworfen. Das Sediment wurde bei der Hämolysemethode mit 20 ml, bei der Dextran-sedimentationsmethode mit 10 ml nicht markiertem Plasma resuspendiert und autolog transfundiert. Unmittelbar davor wurden aus dem Vollblut wie aus den Konzentraten Proben zur Bestimmung der injizierten Granulozytenaktivität entnommen. Diese wurden entsprechend der Methode aufbereitet, wie sie unten bei der Aktivitätsbestimmung der Granulozyten nach der Reinjektion beschrieben ist. Aus der gemessenen Granulozytenaktivität wurde unter Berücksichtigung des Blutvolumens (8% des Körpergewichtes) ein Sollwert an Granulozytenaktivität pro ml errechnet.

* ACD-Lösung A: Natrium citricum 2,55, Acid. citricum 0,80, Dextrose 1,2, Aqua bidest. ad 100,0.

** Dextran: MG 250 000, 3proz. in physiol. NaCl-Lösung.

*** DF³²P: Di-isopropyl-phosphorfluoridate-P³², spezifische Aktivität 200–400 µCi/mg, bezogen durch Fa. Buchler, Braunschweig.

III. Bestimmung der Granulozytenaktivität

- a) Die Abnahmen erfolgten 3 Min, 1, 2, 4 und 6 h nach der Transfusion. Dabei wurden stets 18 ml Blut in graduieren Spritzen entnommen, die jeweils 2 ml ACD-Lösung enthielten.
- b) Zur Hämolyse der Erythrozyten wurde das Blut-ACD-Gemisch in ein 200-ml-Zentrifugenglas mit 80 ml 0,83proz. NH_4Cl -Lösung eingefüllt und 10 Min. stehen gelassen. Eine Elution des DF^{32}P fand dadurch nicht statt [6]. Die Lymphozyten mußten nicht beseitigt werden, da sie nur unwesentlich mit DF^{32}P markiert wurden [2].
- c) Zur Entfernung des Erythrozytenhämolsats und der Thrombozyten wurde das Gemisch bei 300 g 10 Min. zentrifugiert und der Überstand abgekippt.
- d) Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Erythrozytenmembranen zu vermeiden, wurde das Sediment in 20 ml NH_4Cl resuspendiert und erneut bei 300 g 15 Min. zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgekippt wurde, wurde das Sediment in 1 ml 0,9proz. NaCl resuspendiert.
- e) Je 0,2 ml der Zellsuspension wurden in 2 Meßgläsern mit je 10 ml Szintillationsflüssigkeit* eingefüllt und die Radioaktivität in einem Liquidszintillationszähler** gemessen.
- f) Aus den Mittelwerten der beiden Proben wurde die Granulozytenaktivität pro ml Blut berechnet und in Prozent des Sollwertes im halblogarithmischen Maßstab gegen die Zeit aufgetragen.

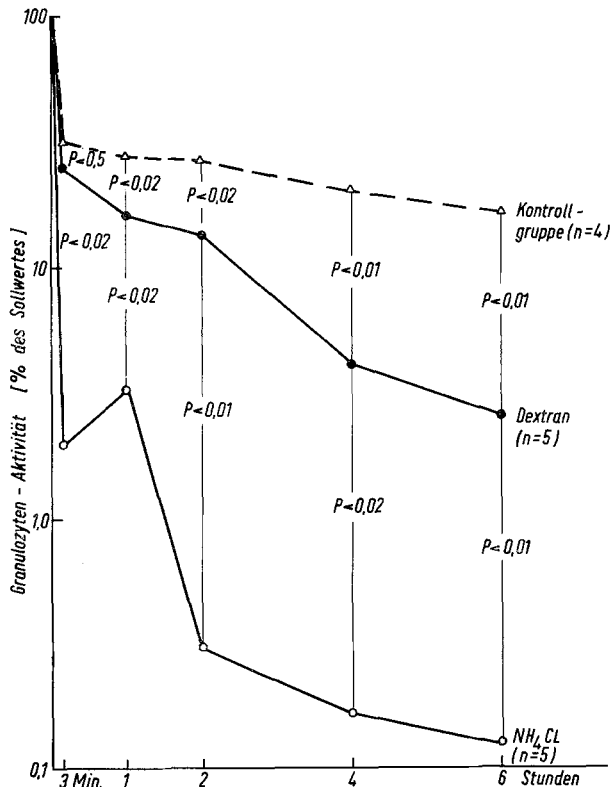


Abb. 1: Verlauf der Granulozytenaktivitätskurven nach Markierung mit DF^{32}P in Prozent des Sollwertes.

* Braysche Lösung: Naphthalin 60,0, POPOP 0,2, PPO 4,0, Methanol 100 ml, Paradoxan ad 1000,0.

** Liquidszintillationszähler: NE 8312, Fa. Nuclear Enterprises Schottland.

Ergebnisse

1. Kurvenverläufe

Der Verlauf der mittleren Granulozytenaktivitäten der drei untersuchten Gruppen ist in Abb. 1 dargestellt.

- a) Sedimentation mit Dextran: Bei den mit Dextran isolierten Granulozyten betrug die mittlere Granulozytenaktivität 3 Min. nach Ende der Retransfusion noch 25,8% des Sollwertes. Bei einem annähernd exponentiellen Verlauf fällt die Kurve 6 Stunden nach der Retransfusion auf 2,5% ab.
- b) Hämolyse durch NH_4Cl : Bei den Granulozyten, die durch Hämolyse der Erythrozyten isoliert worden waren, konnten 3 Min. nach Ende der Retransfusion nur noch 2% der Aktivität des Sollwertes festgestellt werden. Nach einem nicht signifikanten Anstieg nach 1 Stunde auf 3,4% ist die Aktivität nach 2 Stunden auf Werte um 0,3% abgefallen. Alle Kurvenpunkte liegen signifikant niedriger als die bei der Sedimentation mit Dextran.
- c) Kontrollgruppe: Bei den in Vollblut markierten Granulozyten wurden 3 Min. nach Ende der Retransfusion noch 31,6% der Aktivität des Sollwertes gemessen. Die Kurve der mittleren Granulozytenaktivität fällt bei einem exponentiellen Verlauf 6 Stunden nach der Retransfusion auf 16,5% ab. Die Kurve verläuft mindestens vom 1-Stunden-Wert an in allen Punkten signifikant höher als die Kurve nach der Sedimentation mit Dextran und somit auch signifikant höher als die Kurve nach Hämolyse mit NH_4Cl . Die Aktivitätsausbeute 3 Min. nach der Retransfusion ist nicht signifikant von der bei der Sedimentation mit Dextran unterschieden, beide Werte liegen jedoch eindeutig signifikant über dem 3-Minuten-Wert bei der Hämolyse durch NH_4Cl (s. Abb. 2).

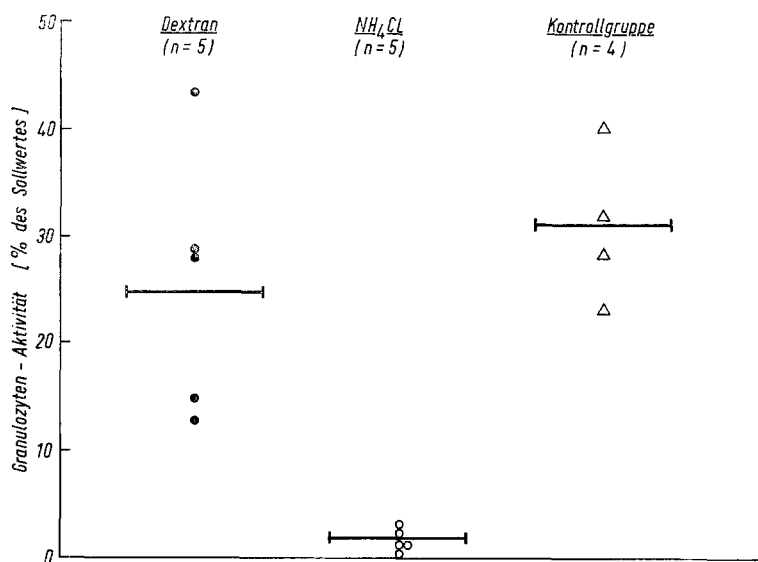


Abb. 2: Granulozytenaktivitäten in Prozent des Sollwertes 3 Min. nach Ende der Retransfusion DF³²P-markierter Granulozyten.

2. Granulozytenlebensdauer

Als Parameter für die Granulozytenlebensdauer diente die Halbwertszeit der Aktivitätskurven. Dabei wurde der 3-Minuten-Wert als Bezugspunkt angenommen und alle übrigen Kurvenpunkte in Prozent dieses Wertes angegeben. Die so erhaltene mittlere Halbwertszeit betrug bei den mit Hilfe der Dextran-sedimentation konzentrierten Granulozyten 1,6 Stunden, bei den nicht isolierten Granulozyten dagegen 6,6 Stunden (s. Abb. 3). Zwischen den beiden Werten besteht ein signifikanter Unterschied, wobei $p < 0,01$ ist.

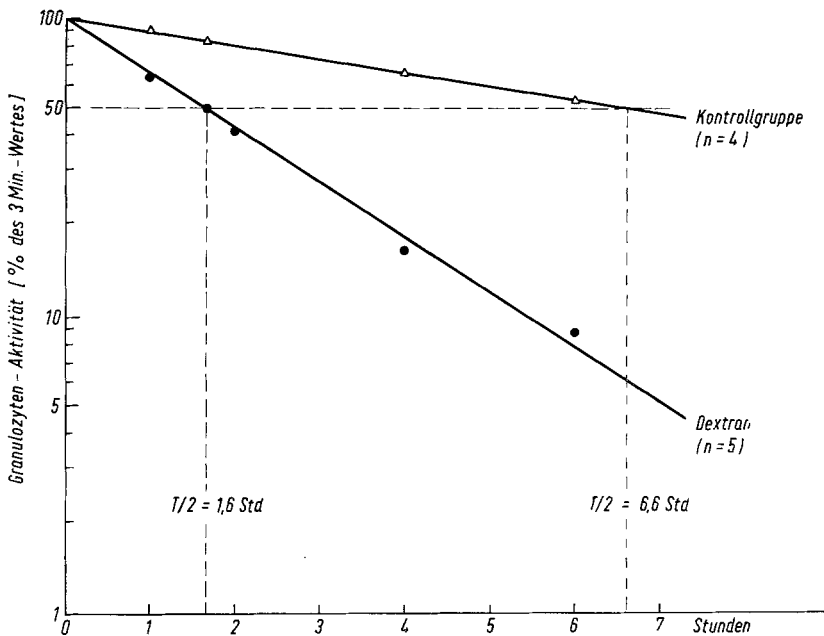


Abb. 3: Halbwertszeiten der Granulozytenaktivität nach Markierung mit $DF^{32}P^-$ ohne Anreicherung der Granulozyten (Kontrolle, $n = 4$) und nach Anreicherung der Granulozyten durch Sedimentation der Erythrozyten mit Dextran ($n = 5$).

Bei der NH_4Cl -Methode wurde 3 Min. nach der Retransfusion nur noch ein verschwindend geringer Anteil an Granulozytenaktivität von 2% des Sollwertes ermittelt. Bei diesen verbliebenen 2% an Granulozytenaktivität konnte wegen der geringen Aktivität und des wohl damit zusammenhängenden unklaren Kurvenverlaufes keine Halbwertszeit bestimmt werden.

Besprechung

1. Schädigung der Granulozyten durch die Sedimentationsmethode mit Dextran

Granulozyten, die mit Hilfe der Sedimentation der Erythrozyten durch Dextran konzentriert wurden, weisen zwar gegenüber der Kontrollgruppe keine signifikant niedrigere Aktivitätsausbeute 3 Min. nach der Retransfusion,

jedoch eine erheblich verkürzte Halbwertszeit auf. Dies kann am ehesten durch eine Zellschädigung durch das verwendete Isolierungsverfahren erklärt werden. Ob diese Schädigung der Granulozyten durch alleinige Einwirkung des Dextrans auf die Zellen oder durch die verlängerte Exkorporierung der Zellen (um eine Stunde länger als bei der Kontrollgruppe) oder durch die Addition beider Komponenten verursacht wurde, wurde von uns dabei nicht geprüft. Uns kam es darauf an, zu untersuchen, ob diese Methode insgesamt eine Veränderung der Lebensdauer hervorruft.

Die mittlere Aktivitätsausbeute 3 Min. nach der Retransfusion sowohl bei der Dextransedimentation als auch bei der Kontrollgruppe ist mit 25,8 bzw. 31,6% auffallend niedrig. Eine Erklärung hierfür können wir nicht geben. Möglicherweise spielt dabei neben der Zellschädigung auch das Vorhandensein eines Granulozytenpools, der von *Athens* [4] diskutiert wird, eine Rolle.

2. Schädigung der Granulozyten durch die Hämolysemethode mit NH_4Cl

Granulozyten, die durch Hämolyse der Erythrozyten mit NH_4Cl isoliert werden, werden offenbar durch diese Methode so stark geschädigt, daß nur noch ein geringer Prozentsatz an Granulozytenaktivität im peripheren Blut nachgewiesen werden kann. Aus dem Kurvenverlauf geht klar hervor, daß auch die noch vorhandenen wenigen Granulozyten sehr viel rascher als bei der Kontrollgruppe zugrunde gehen. Der geringe Kurvenanstieg 1 Stunde nach der Retransfusion könnte durch einen möglichen Wiederaustritt markierter Zellen aus dem oben erwähnten Granulozytenpool erklärt werden. Allerdings hätten wir dann keine Erklärung dafür, warum diese Ausschüttung bei der Kontrollgruppe und bei der Dextransedimentation nicht in gleicher Weise stattfindet. Da der 1-Stunden-Wert nicht signifikant höher als der 3-Minuten-Wert liegt, könnte der Kurvenanstieg durch den bei den niedrigen Aktivitäten auftretenden hohen Meßfehler erklärt sein.

Somit kann die Gewinnung von Granulozyten zu Transfusionszwecken durch Hämolyse der Erythrozyten mit NH_4Cl als ungeeignet angesehen werden. Die geprüfte Methode zur Gewinnung der Granulozyten durch Sedimentation der Erythrozyten mit Dextran erscheint nur bedingt brauchbar. Daher halten wir es für sinnvoll, nach weiteren Methoden zur Anreicherung von Granulozyten aus Normalblut für Transfusionszwecke zu suchen.

Wir danken den med.-techn. Assistentinnen Fr. *Ursula Honauer* und Fr. *Margarethe Keim* für die ausgezeichnete Zusammenarbeit bei der Durchführung der Untersuchungen. Frau *Christa Majumdar* danken wir für die Ausführung der Zeichnungen, Fr. *Margret Schlegel* für die Durchführung der photographischen Arbeiten.

Zusammenfassung

Es wurde die Schädigung der Granulozyten durch Isolierung mit Dextran oder NH_4Cl an Hand der Bestimmung der Lebensdauer in vivo von DF³²P-markierten, autolog transfundierten Granulozyten geprüft. Bei fünf Personen, bei denen die Granulozyten durch Sedimentation der Erythrozyten mit Dextran angereichert worden waren, war die Halbwertszeit der Granulozytenaktivität mit 1,6 Stunden gegenüber 6,6 Stunden bei der Kontrollgruppe stark

verkürzt. Bei fünf Personen, bei denen die Granulozyten durch Hämolyse der Erythrozyten mit NH_4Cl angereichert worden waren, waren 3 Min. nach Retransfusion nur noch 2% an Granulozytenaktivität im peripheren Blut nachweisbar. Somit kann die Gewinnung von Granulozyten zu Transfusionszwecken durch Hämolyse der Erythrozyten mit NH_4Cl wegen starker Zellschädigung als unbrauchbar, durch Sedimentation der Erythrozyten mit Dextran als nur bedingt geeignet angesehen werden.

Summary

The damage of granulocytes by isolation with dextran or ammoniumchloride was studied by evaluating the survival time of DF^{32}P -labeled autologous granulocytes. In five normal persons the granulocytes were concentrated by sedimentation of erythrocytes with dextran. In these cases the half life of granulocytes was significantly reduced with 1,6 hours in comparison with 6,6 hours of a control. In five other cases the granulocytes were concentrated by hemolysing the erythrocytes with ammoniumchloride. There only 2 percent of activity was detectable in peripheral blood three minutes after retransfusion. It is suggested that isolation of granulocytes by hemolysing the erythrocytes with ammoniumchloride cannot be used for transfusion of granulocytes because of severe cell damage. Isolation of granulocytes by sedimentation of erythrocytes with dextran only seems to be of limited value for transfusion.

Literatur: 1 Agostoni, A. and G. Idéo: *Separatum Experientia* 21, 82 (1965). — 2 Boggs, D. R., J. W. Athens, G. E. Cartwright and M. M. Wintrobe: *Journ. of Clin. Invest.*, 44/4, 643 (1965). — 3 Freireich, E. J., R. H. Levin, J. Whang, P. P. Carbone, W. Bronson and E. E. Morse: *Annals N. Y., Acad. of Science*, 113, 1081 (1963/64). — 4 Mauer, A. M., J. W. Athens, H. Ashenbrucker, G. E. Cartwright and M. M. Wintrobe: *Journ. of Clin. Invest.*, 39, 1481 (1960). — 5 Morse, E. E., E. J. Freireich, P. P. Carbone, W. Bronson and E. Frei: *Transfusion* 3, 183 (1965). — 6 Pfisterer, H. und H. Bolland: *Eigene Untersuchungen*. — 7 Pfisterer, H., H. Bolland, J. Nennhuber und W. Stich: *Klin. Wschr.* 45/19, 995 (1967).

Anschr. d. Verff.: Dr. med. H. Bolland, Städt. Krankenhaus Landshut, 83 Landshut/Ndb., Robert-Koch-Straße 1; Dr. med. H. Pfisterer, Institut für Hämatologie der GSF, 8 München 15, Ziemssenstraße 1.