

Untersuchungen zur Elimination von Osteosarkomzellen durch maschinelle Autotransfusion und Leukozyten-Depletionsfilter

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Christoph Franz Hirsch

aus Ravensburg

Giessen 2003

Aus dem Medizinischen Zentrum für
Chirurgie, Anaesthesiologie und Urologie
Abteilung Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin
Leiter: Prof. Dr. Dr. h.c. G. Hempelmann
des Universitätsklinikums Giessen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. G. Hempelmann

Gutachter: Prof. Dr. H. Pralle

Tag der Disputation: 21.10.2003

1 Einleitung	5
2 Fragestellung	8
3 Methodik	9
3.1 Material und Methode	9
3.2 Nachweismethoden	12
3.2.1 Papanicolaou - Klassifikation	12
3.2.2 Immunocytochemische Untersuchung	13
3.2.3 DNA - Analyse	15
4 Ergebnisse	17
4.1 Ergebnisse der Papanicolaou - Klassifikation	17
4.2 Ergebnisse der Untersuchung mittels Immunzytochemie	17
4.3 Ergebnisse der DNA-Analyse	19
5 Diskussion	21
5.1 Diskussion der Methodik	21
5.2 Risiken der homologen Transfusion	23
5.3 Der Einsatz der fremdblutsparenden Verfahren in der Tumorchirurgie	25
5.3.1 Präoperative Eigenblutspendeverfahren bei Tumoroperationen	25
5.3.2 Maschinelle Autotransfusion in der Tumorchirurgie	27
5.3.3 Elimination von Tumorzellen durch die maschinelle Autotransfusion mit Bestrahlung des Erythrozytenkonzentrates	30
5.3.4 Elimination von Tumorzellen durch den Einsatz von Porenfiltern	31

5.3.5.1 Elimination von Tumorzellen durch den Einsatz von Leukozyten-Depletionsfiltern	32
5.3.5.2 Elimination von Osteosarkomzellen	33
5.4 Schlussfolgerung	36
6 Zusammenfassung	37
7 Literaturverzeichnis	39
8 Abbildungen und Tabellen	47
Danksagung	57
Lebenslauf	58

1 Einleitung:

Angesichts der Risiken homologer Bluttransfusionen haben fremdblutsparende Verfahren in der operativen Medizin große Bedeutung erlangt.

Durch die präoperative Plasmapherese, die präoperative Eigenblutspende, die normovolämische Hämodilution und die intra- und postoperative maschinelle Autotransfusion kann der Bedarf an homologen Blutprodukten, als Gesamtkonzept der autologen Transfusion, bei elektiven chirurgischen Eingriffen entscheidend verringert werden [13, 48, 97]. Darüber hinaus kann der Einsatz von homologen Erythrozytenkonzentraten auch durch die Gabe von Erythropoetin vermindert werden [34]. Der Einsatz von Aprotinin kann den Transfusionsbedarf in der Herzchirurgie, bei großen orthopädischen Eingriffen und bei Leberresektionen verringern [21, 66, 67]. Die prophylaktische Gabe von Antifibrinolytika außerhalb der Herzchirurgie wird aber weiterhin kontrovers diskutiert [58]. Inwieweit neu entwickelte Sauerstoffträgermedien zur Einsparung von Blutprodukten führen, ist derzeit noch nicht zu beurteilen [100]. Am Ende wird der Fremdblutbedarf aber immer auch von dem Transfusionsregime der behandelnden Kliniken bestimmt [101].

Bei Patienten, die an Malignomen operiert werden müssen, besteht ein häufiger Transfusionsbedarf. Etwa ein Viertel aller transfundierten Blutkonserven wird für Tumorpatienten verwendet [29, 36]. Die unerwünschten Wirkungen einer Transfusion von Fremdblut stellen mit der Übertragung von infektiösen Erkrankungen, mit einer Immunsuppression, mit Transfusionsreaktionen, mit graft-versus-host Reaktionen und mit einer möglichen Inkompatibilität ein nicht unerhebliches Problem dar [33]. Gerade bei Tumorpatienten sind die unerwünschten Wirkungen mit besonderen Risiken verbunden. So kann es bei der Übertragung von Infektionskrankheiten aufgrund des eingeschränkten Allgemeinzustandes dieser Patienten zu besonders schweren Verläufen kommen. Homologe Transfusionen führen zu einer Immunmodulation, und es konnte eine höhere postoperative Infektionsrate nachgewiesen werden [15, 55, 88]. Postoperative Komplikationen verzögern den Heilungsverlauf und die eventuell nötigen adjuvanten Therapien der Grunderkrankung. Hingegen ist die Frage nach einer klinisch relevanten Beeinflussung des Krankheitsverlaufs der malignen Erkrankung durch die Immunmodulation noch nicht endgültig geklärt [7, 19, 28, 42]. Nicht zuletzt sollte jedoch

bei jeder Fremdblutgabe berücksichtigt werden, dass die Ressourcen für homologe Blutprodukte beschränkt sind.

Der Einsatz der präoperativen fremdblutsparenden Verfahren ist zwar medizinischer Standard, doch lassen sich diese Verfahren nicht uneingeschränkt bei Patienten anwenden, die an soliden Tumoren operiert werden müssen. Der häufig reduzierte Allgemeinzustand dieser Patienten, eine mögliche präoperative Anämie durch Blutverlust oder eine Tumoranämie und die zügige Operationsplanung spiegeln die Probleme der präoperativen Eigenblutspendeverfahren wider.

Die intra- und postoperative maschinelle Autotransfusion (MAT) ist als Bestandteil des Konzeptes zur autologen Transfusion ein etabliertes Verfahren [13, 45, 48, 74, 97]. Sie hat bei großen orthopädischen Operationen, die häufig mit einem hohen Blutverlust einhergehen, zu einer intraoperativen Fremdbluteinsparung zwischen 68 und 95% geführt [48]. Bei diesem Verfahren wird das Blut aus dem Operationsgebiet unter kontinuierlicher Antikoagulation mit Heparin in einen sterilen Auffangbeutel abgesaugt. Blutverlustabhängig kann dann mit der MAT begonnen werden. Aus dem Reservoir wird das gesammelte Blut nach einer Primärfilterpassage in eine Zentrifugenglocke gepumpt. Dort werden die Erythrozyten separiert, mit physiologischer Kochsalzlösung mehrfach gewaschen und anschließend konzentriert. Zur Retransfusion wird das Erythrozytenkonzentrat in einen Transfusionsbeutel überführt.

Da bei Tumoroperationen in über 90% der Fälle Tumorzellen im Wundblut nachgewiesen werden können [35], wird der Einsatz der MAT auch im Rahmen der orthopädischen Tumorchirurgie wegen der Gefahr einer systemischen Tumorzellaussaat als kontraindiziert angesehen [84, 109].

In einer Studie von Hart et al. ist der Einsatz der MAT in Kombination mit einem Porenfilter (20 Mikrometer) bei Operationen von Blasenkarzinomen angewandt worden [41]. Bei einer Patientenanzahl von 49 und einer Nachbeobachtung von mindestens einem Jahr wurden diese Krankheitsverläufe mit vorliegenden Daten aus der Literatur verglichen. Es konnten hierbei keinerlei Änderungen des Krankheitsverlaufs erkannt werden. Damit wurde die Unbedenklichkeit dieser Methode bezüglich einer Tumorzellaussaat angenommen. Der Einsatz der MAT in Kombination mit einem Leukozyten-Depletionsfilter wurde bei drei urologischen Tumorzelllinien in vitro untersucht [108]. Die Tumorzellen wurden in diesem Versuchsaufbau radioaktiv markiert. Es konnten nach

Aufbereitung der Tumorzellsuspension mit der MAT und Filtration durch den Leukozyten-Depletionsfilter keine Tumorzellen mehr nachgewiesen werden.

Von großer Bedeutung sind daher alle Verfahren, welche eine Elimination von Tumorzellen aus dem Wundblut bewirken können. Nur die Elimination der Tumorzellen verhindert eine mögliche generalisierte Tumorzell dissemination mit der Gefahr von Tochtergeschwülsten.

Bei Operationen zur Resektion von Osteosarkomen werden regelmäßig hohe Blutverluste beobachtet, die häufig zu Transfusionsbedarf führen. Der Blutverlust kann bei diesen Operationen auch präoperativ nur schlecht abgeschätzt werden. Deshalb besteht gerade hier ein großes Interesse, den Fremdblutbedarf zu reduzieren. Um die Elimination von Osteosarkomzellen durch MAT und Passage durch einen Leukozyten-Depletionsfilter beurteilen zu können, wurden bei diesen Untersuchungen die Ausgangssuspension dem Wundblut bei einer solchen Operation nachgestellt. Wir verwendeten dazu kultivierte humane Osteosarkomzellen eines 14-jährigen Jungen [4] in Suspension mit einem homologen Erythrozytenkonzentrat und Natriumchloridlösung.

2 Fragestellung:

In der vorliegenden in vitro-Studie soll die Frage beantwortet werden, ob ein maschinelles Autotransfusionssystem in Verbindung mit einem handelsüblichen Leukozyten-Depletionsfilter in der Lage ist, kultivierte humane Osteosarkomzellen der Zelllinie MG 63 aus einer Suspension mit einem homologen Erythrozytenkonzentrat und Natriumchloridlösung zu separieren.

3 Methodik:

3.1 Material und Methode:

Zur Herstellung definierter Tumorzellsuspensionen verwendeten wir Langzeittumorzelllinien von Osteosarkomen. Die humanen Osteosarkomzellen der Zelllinie MG 63 (Zellbank American Tissue Culture Collection, Rockville, MB, USA: CRL 1427) wurden aus dem Zellkulturlabor des Zentrums für Pathologie des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen bezogen. Die Osteosarkomzelllinie stammt von dem Osteosarkom eines 14 jährigen Jungen [4]. Diese Zellen wurden nach einer Vitalitätskontrolle unter der Aufsicht von Dr. Hinrichs quantitativ mit dem Zellzählungsgerät Coulter Counter S PLUS STKR[®] (Fa. Shandon, Frankfurt a. M., Deutschland) bestimmt und anschließend in Dulbecco`s modified eagles medium (DMEM) [17] als Suspension von 100ml gewonnen.

Zu jedem Versuch wurde ein Erythrozytenkonzentrat (DRK Blutspendedienst Hessen, Frankfurt a.M., Deutschland) mit 100ml NaCl 0,9% (Fa. B. Braun, Melsungen, Deutschland) aufgeschwemmt. Die Erythrozytenkonzentrate waren in Additivlösung SAG-Manitol suspendiert, zwischen 20 und 26 Tage alt und wurden aus dem Rücklaufbestand der Blutbank bezogen. Vom Erythrozytenkonzentrat wurden 300ml zusammen mit 500ml NaCl 0,9% (Fa. B. Braun, Melsungen, Deutschland) mit jeweils 100ml der Tumorzellsuspension in das Reservoir des handelsüblichen Autotransfusionssystems DIDECO codice 710[®] (Dideco, Mirandola, Italien) infundiert.

Zur weiteren Durchmischung des Versuchsansatzes wurde das Autotransfusionsreservoir bis zur Aufbereitung in wechselnder Richtung langsam gedreht.

Mit dem Standardprogramm des Autotransfusionsgerätes DIDECO BT 795 / P[®] (Dideco, Mirandola, Italien) wurde diese Suspension unter Zuhilfenahme der Funktion "Better Wash Quality" als einer Möglichkeit, die den Waschvorgang mit einer erhöhten Waschlösungsmenge von 1000ml und mit dreimaliger Reduzierung der Zentrifugationsgeschwindigkeit durchführt, wie folgt aufbereitet: Aus dem Autotransfusionsreservoir wurde die Zellsuspension des Versuchsansatzes nach der

Passage des integrierten Porenfilters mit einem Durchmesser von 40 Mikrometer in die Zentrifugenglocke gepumpt. Durch die angewandte Zentrifugalkraft wurde die Blutsuspension anschließend in der Glocke entsprechend dem spezifischen Gewicht seiner einzelnen Komponenten konzentriert und separiert. Berechnungen zu den genauen physikalischen Werten der Sedimentation und der Zentrifugalbeschleunigung wurden vom Hersteller durchgeführt. Sie sind spezifisch für die jeweilige, auf Latham-Glocken basierenden, Glockenform. Die Erythrozyten sedimentieren während der Zentrifugation mit ca. 4000 Umdrehungen pro Minute an der Glockenwand. Der Füllvorgang wurde beendet, sobald die Ausgangssuspension vollständig in die Zentrifugenglocke überführt war. Das Gerät wechselte nun automatisch zum Waschvorgang, bei dem intermittierend insgesamt 1000 ml Kochsalzlösung 0,9% (Fa. B. Braun, Melsungen, Deutschland) in die Zentrifugenglocke gepumpt und das Zellsediment ausgewaschen wurde. Der Überstand wurde in einen Abfallbeutel abgeführt.

Nach diesem automatischen Waschvorgang wurden die aufbereiteten Erythrozyten in einen Transfusionsbeutel überführt. Das so gewonnene Erythrozytenkonzentrat wurde anschließend schwerkraftabhängig durch den Leukozyten-Depletionsfilter PALL BPF 4® (Fa. Pall Biomedizin, Dreieich, Deutschland) gefiltert. Mit diesem Filtersystem lassen sich in der ursprünglichen Indikation Leukozyten, Thrombozyten und Mikroaggregate durch Adhäsion an einer Kunststoffoberfläche aus einer Suspension entfernen. Diese Filtersysteme bestehen hauptsächlich aus Polyester und Acrylpolymeren.

Zur Untersuchung der Elimination von Osteosarkomzellen führten wir acht Versuchsreihen durch. Die Tumorzellkonzentrationen in der Ausgangssuspension wählten wir anhand von Daten aus der Literatur, um die Untersuchung den realen Gegebenheiten des gesammelten Wundblutes bei Tumoroperationen anzugleichen [35].

In den Experimenten eins bis fünf wurden dem Versuchsansatz je 9 Millionen Tumorzellen zugesetzt. Dies führte zu Konzentrationen von 10000 Osteosarkomzellen/ml in den Ausgangssuspensionen von 900ml, bestehend aus Tumorzellen, Erythrozytenkonzentrat und Natriumchloridlösung 0,9%.

In den weiteren Versuchsreihen (Versuche sechs bis acht) wurde die Tumorzellmenge im Versuchsansatz von 6,5 Millionen über 1,5 Millionen auf 150000 Zellen verringert, um auch das Verhalten von geringeren Zellzahlen zu untersuchen. Diese Reihe führte bei einem Ausgangsvolumen von 900ml zu Tumorzellkonzentrationen von 7222/ml, 1667/ml und 167/ml in der Ausgangssuspension.

Um die Eliminationswirksamkeit des Autotransfusionssystems und des Leukozyten-Depletionsfilters beurteilen zu können, wurden nach gründlichem Durchmischen jeweils 10 Proben von je 1ml aus der Ausgangssuspension (a) sowie aus dem aufbereiteten Erythrozytenkonzentrat vor (b) und nach Passage des Leukozyten-Depletionsfilters (c) entnommen. Aus diesen Proben wurden Zytozentrifugate angefertigt (Zytozentrifuge „Cytospin 2[®]“, Firma Shandon, Frankfurt a.M., Deutschland). Für die verschiedenen Nachweisverfahren wurden die Zentrifugate anschließend wie folgt bearbeitet.

3.2 Nachweismethoden:

3.2.1 Papanicolaou - Klassifikation:

Zur histologischen Untersuchung wurden die Zytozentrifugate nach Hämatoxylin-Eosin [17] und Pappenheim [82] gefärbt. Anschließend wurden sie von zwei Pathologen unabhängig voneinander nach der Papanicolaou-Klassifikation auf Tumorzellen hin untersucht [9] (Bild 1).

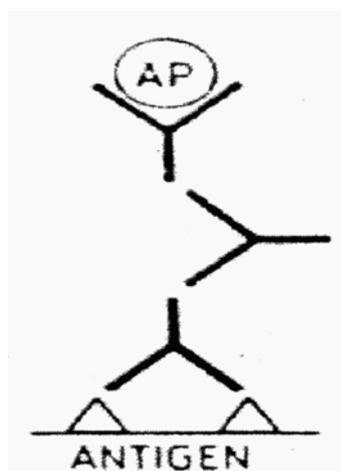
Tabelle 1: Einteilung nach Papanicolaou (modifiziert nach Blümcke [9])

Papanicolaou-Klassifikation	deskriptive Klassifikation
PAP 1	normale Zellen
PAP 2	Zellen ohne Tumorverdacht (z.B. bei Entzündung)
PAP 3	verdächtige Zellen
PAP 4	starker Verdacht auf maligne Zellen
PAP 5	maligne Zellen

3.2.2 Immunozytochemische Untersuchung:

Als weiteren Nachweis für Osteosarkomzellen führten wir immunozytochemische Untersuchungen an den Zytozentrifugaten durch. Zum Nachweis diente die konstante Expression des Intermediärfilamentes Vimentin der Osteosarkomzellen.

Als morphologischer Nachweis wurde die Alkalische Phosphatase Anti Alkalische Phosphatase Komplex-Methode (APAAP-Komplex-Methode) angewandt. Bei dieser indirekten immunenzymatischen Methode wird an den primären monoklonalen Antikörper (V9, Intermediärfilament Vimentin) als zweiter Schritt ein Brückenantikörper (Z259, rabbit-anti-mouse) gebunden. Dieser im Überschuss zugegebene Brückenantikörper reagiert dann mit dem APAAP-Komplex der gleichen Tierart (D 651 mouse monoclonal), von der auch der primäre Antikörper stammt. Die alkalische Phosphatase dient als Markerenzym für das Antigen Vimentin der Osteosarkomzellen (Antikörper und Entwicklungslösung: Fa. DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland). Die Enzymaktivität wird durch eine entsprechende Entwicklungslösung (Fast Blue) als blaue Farbreaktion sichtbar gemacht [63] (Bild 2).



APAAP-Komplex mit Antikörper

Brückenantikörper

Primärer Antikörper gegen Vimentin

Abbildung 1: APAAP-Komplex-Methode

Es erfolgte eine semiquantitative Graduierung der Farbreaktion nach folgendem Schema:

Tabelle 2: Einteilung der Vimentinexpression

Vimentinexpression	Einteilung nach Farbreaktion
Negativ	-
Schwach	+
Positiv	++
stark positiv	+++

3.2.3 DNA-Analyse:

Zur DNA-Analyse erfolgte eine Feulgenfärbung [63, 77] der Zytozentrifugate (Bild 3). Das Feulgen-Reaktionsprodukt bindet stoichiometrisch an DNA, so dass die resultierende optische Dichte ein Maß für den nukleären DNA-Gehalt darstellt. Es erfolgte eine quantitative Bestimmung des nukleären DNA-Gehaltes der Zellen nach der von Böcking und Mitarbeitern beschriebenen Methode für statistische Einzellzytometrie [10].

Als Messsystem wurde ein Bildanalysegerät (IBAS[®] Firma Kontron, München, Deutschland) verwendet. Gemessen wurden die Präparate bei 63-facher Objektivvergrößerung.

Die Messung der integrierten optischen Dichte der Zellkerne erfolgte interaktiv am Monitor eines mit einem konventionellen Mikroskop gekoppelten Fernsehbild-Analysesystems. Nach Auswahl der Zellen durch den gleichen Untersucher erfolgte primär ein Graustufenabgleich zur Hintergrundgrauwertkorrektur. Mit der anschließenden Bestimmung des Extinktionswertes der Zellkerne wurde der Wert für den entsprechenden DNA-Gehalt errechnet. Die DNA-Verteilung der Zellkerne, als spezifisch optische Dichte gemessen, führt zu einer Häufigkeitsverteilung des Ploidiegrades. Mit einer Messung des Ploidiegrades von Zellkernen kann die Malignität einer Zellsuspension geprüft werden. Koss et al. [63] zeigten in ihrer Beschreibung ein Beispiel zur Untersuchung von einer benignen Zellsuspension im Vergleich zu drei malignen Zellsuspensionen. Das Maximum bei den diploiden Werten $2n$ ($1n$ entspricht der DNA-Menge eines einfachen Chromosomensatzes) und dem tetraploiden Wert $4n$ ergeben die Verteilung der Extinktionswerte einer benignen Zellsuspension.

Die DNA-Verteilung bei benignen Zellen zeigt ein Maximum bei diploiden Extinktionswerten ($2n$) des DNA-Gehalts. Es können jedoch auch regelmäßig tetraploide Werte ($4n$) gemessen werden, wenn sich Zellen in der G₂- oder in der M-Phase des Zellzyklus befinden. DNA-Extinktionswerte zwischen diesen Phasen ($2n$ und $4n$) repräsentieren die Synthesephase im Zellzyklus. Zellsuspensionen mit malignen Zellen weisen in der DNA-Verteilung eine Aneuploidie einschließlich auch hypertetraploider Werte auf (Abbildung: 2).

Als Referenzsystem für den diploiden DNA-Gehalt bei unserer Untersuchung, entsprechend "2n", wurden Zytozentrifugate von Fibroblastenkulturen verwendet. Diese Präparate wurden in einem Nebenversuch ebenfalls nach Zytozentrifugation einer Feulgenfärbung unterzogen und anschließend in Relation als diploide Standardzellen gemessen. Diese Messdaten für den DNA-Gehalt ergaben den Wert für einen diploiden Zellverband (Abbildung 3).

Abweichungen der Chromosomen bzw. des DNA-Gehaltes werden als Aneuploidie bezeichnet. Dem Nachweis chromosomaler Aneuploidie kann die Funktion eines Markers für eine neoplastische Transformation der Zelle zugeschrieben werden.

Der Schwellenwert für hypertetraploide und somit sicher maligne Zellen als Nachweis für Osteosarkomzellen wurde mit einem DNA-Gehalt entsprechend "5n" festgelegt (Abbildung 4).

Bei den Messungen wurden zum einen die absolute Anzahl kernhaltiger Zellen bestimmt und zum anderen die Zellen ermittelt, die den Schwellenwert des DNA-Gehaltes von "5n" überschritten. Der prozentuale Nachweis hypertetraploider Zellen wurde mittels gepaartem T-Test verglichen.

Tabelle 3: Einteilung der DNA-Analyse

Absolute Anzahl kernhaltiger Zellen (k)
Absolute Anzahl hypertetraploider Zellen (h)

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Papanicolaou - Klassifikation:

Bei der Untersuchung nach der Papanicolaou - Klassifikation konnten in allen Proben der Versuchsansätze 1a-7a maligne Zellen nachgewiesen werden. Nach der maschinellen Aufbereitung im Autotransfusionsgerät waren in allen Proben (1b, 2b, 4b-7b) Zellen mit der Klassifikation PAP 5, also maligne Zellen, nachzuweisen. Eine Ausnahme bildete der Versuch 3. Die Zellen der Probe 3b wurde nach PAP 3, also verdächtige Zellen ohne sicheren Tumorverdacht, klassifiziert.

Die nach der Passage des Leukozyten-Depletionsfilters entnommenen Proben (1c-8c) wurden alle als Zellen ohne Tumorverdacht (PAP 1) klassifiziert.

Bei dem Versuchsansatz 8 mit einer Tumorzellkonzentration von lediglich 167/ml wurden sowohl im Versuchsansatz (8a) als auch nach MAT (8b) die Proben mit PAP 1, also als Zellen ohne Tumorverdacht, beurteilt (Tabelle 4).

4.2 Ergebnisse der Untersuchung mittels Immunzytochemie:

Der Nachweis einer Vimentinexpression als Marker für Osteosarkomzellen ließ sich in den Versuchsreihen 1–7 sowohl im Versuchsansatz (1a-7a) als auch nach der maschinellen Aufbereitung im Autotransfusionsgerät (1b-7b) positiv führen.

Im Versuch 8 mit einer Tumorzellkonzentration von 167 Tumorzellen/ml war nur im Versuchsansatz (8a) eine positive Vimentinexpression als Osteosarkomzellnachweis vorhanden.

Nach der Passage des Leukozyten-Depletionsfilters (1c-8c) war in allen Versuchen keine Vimentinexpression mehr nachzuweisen, was eine Elimination der zugesetzten Osteosarkomzellen bedeutet (Tabelle 4).

Tabelle. 4: Papanicolaou-Klassifikation (PAP) und Immunzytochemie:

PAP-Klassifikation:

Normale Zellen (PAP 1), regelwidrige Zellen ohne Tumorverdacht (PAP 2), verdächtige Zellen (PAP 3), stark verdächtige Zellen (PAP 4), maligne Zellen (PAP 5).

Immunzytochemie (Vimentinexpression):

Stark positiv (+++), positiv (++), schwach positiv (+), negativ (-).

Nr.:	Messzeitpunkt:	Tumorzell-konzentration:	PAP-Klassifikation:	Vimentin-expression:
1a	Ansatz (a)	10000/ml	5	++
1b	Vor Leuk.-Filter (b)		5	+
1c	Nach Leuk.-Filter (c)		1	-
2a	Ansatz (a)	10000/ml	5	++
2b	vor Leuk.-Filter (b)		5	+
2c	nach Leuk.-Filter (c)		1	-
3a	Ansatz (a)	10000/ml	5	+
3b	vor Leuk.-Filter (b)		1	+
3c	nach Leuk.-Filter (c)		1	-
4a	Ansatz (a)	10000/ml	5	+
4b	vor Leuk.-Filter (b)		5	+
4c	nach Leuk.-Filter (c)		1	-
5a	Ansatz (a)	10000/ml	5	++
5b	vor Leuk.-Filter (b)		5	+
5c	nach Leuk.-Filter (c)		1	-
6a	Ansatz (a)	7111/ml	5	++
6b	vor Leuk.-Filter (b)		5	+
6c	nach Leuk.-Filter (c)		1	-
7a	Ansatz (a)	1667/ml	5	+
7b	vor Leuk.-Filter (b)		5	++
7c	nach Leuk.-Filter (c)		1	-
8a	Ansatz (a)	167/ml	1	+
8b	vor Leuk.-Filter (b)		1	-
8c	nach Leuk.-Filter (c)		1	-

4.3 Ergebnisse der DNA-Analyse:

Mit der DNA-Analyse konnten bei allen Versuchen kernhaltige Zellen im Versuchsansatz (a) und im maschinell aufbereiteten Erythrozytenkonzentrat (b) nachgewiesen werden. Bei diesen Zellen waren konstant Zellkerne mit einem hypertetraploiden Chromosomensatz als Nachweis von Osteosarkomzellen bestimmt worden. Im Mittel waren 20,5% der Zellen im Versuchsansatz hypertetraploid gegenüber 19,1% der Zellen im gewonnenen Erythrozytenkonzentrat.

Auch im Versuch 8 mit der niedrigsten Tumorzellkonzentration waren im Versuchsansatz und im aufbereiteten Erythrozytenkonzentrat sowohl kernhaltige Zellen als auch Zellen mit einem hypertetraploiden Chromosomensatz zu identifizieren.

In allen Proben nach der Passage des Leukozyten-Depletionsfilters waren keine kernhaltigen Zellen mehr nachzuweisen (Tabelle 5).

Tabelle. 5: DNA-Analyse der Zytospinpräparate:

Absolutwert DNA beinhaltender Zellen (Anzahl kernhaltiger Zellen),
Absolutwert eindeutig hypertetraploider Zellen (Anzahl hypertetraploider Zellen)

Nr.:	Messzeitpunkt:	Tumorzell- konzentration:	Anzahl kernhaltiger Zellen (k)	Anzahl hypertetraploider Zellen (h)
1a	Ansatz (a)	10000/ml	27	4
1b	vor Leuk.-Filter (b)		35	4
1c	nach Leuk.-Filter (c)		0	0
2a	Ansatz (a)	10000/ml	27	1
2b	vor Leuk.-Filter (b)		12	0
2c	nach Leuk.-Filter (c)		0	0
3a	Ansatz (a)	10000/ml	15	4
3b	vor Leuk.-Filter (b)		6	1
3c	nach Leuk.-Filter (c)		0	0
4a	Ansatz (a)	10000/ml	24	1
4b	vor Leuk.-Filter (b)		9	3
4c	nach Leuk.-Filter (c)		0	0
5a	Ansatz (a)	10000/ml	9	1
5b	vor Leuk.-Filter (b)		8	0
5c	nach Leuk.-Filter (c)		0	0
6a	Ansatz (a)	7222/ml	11	3
6b	vor Leuk.-Filter (b)		5	1
6c	nach Leuk.-Filter (c)		0	0
7a	Ansatz (a)	1667/ml	21	7
7b	vor Leuk.-Filter (b)		7	3
7c	nach Leuk.-Filter (c)		0	0
8a	Ansatz (a)	167/ml	8	3
8b	vor Leuk.-Filter (b)		7	2
8c	nach Leuk.-Filter (c)		0	0

5 Diskussion:

5.1 Diskussion der Methodik:

In unseren Untersuchungen wurde der Versuchsansatz dem Wundblut bei Operationen an einem Osteosarkom nachgestellt. Aus der Versuchsansatzsuspension, bestehend aus einem homologen Erythrozytenkonzentrat, Natriumchloridlösung und Osteosarkomzellen, wurde primär mittels MAT ein gewaschenes Erythrozytenkonzentrat gewonnen, welches anschließend durch einen Leukozyten-Depletionsfilter gefiltert wurde. Ziel dieses Versuchsaufbaus war, die Möglichkeit zur Retransfusion von autologem Blut bei den blutverlustreichen Eingriffen während der Operation an einem Osteosarkom zu prüfen. Die Tumorzellkonzentrationen entsprachen den in der Literatur angegebenen Werten [35]. Als Eliminationsverfahren wurde die Filtration durch einen Leukozyten-Depletionsfilter gewählt. Dieses Verfahren ist durch seine einfache Logistik in jedem Operationssaal, unabhängig von weiterem Personal und Medizingeräten, durchführbar. Ein Porenfilter mit einer durchschnittlichen Porengröße von 10µm wurde wegen der Variabilität der Porengröße nicht eingesetzt. Osteosarkomzellen mit einer Größe von circa 12 - 19µm würden diesen Filter passieren können.

In der Ausgangssuspension von 900 ml, bestehend aus 500 ml Ringerlösung, 300 ml eines mit 100 ml 0,9% Natriumchloridlösung aufgeschwemmten Erythrozytenkonzentrates und 100 ml der quantitativ bestimmten Tumorzellsuspension mit 9 Millionen Tumorzellen erreichten wir eine Tumorzellkonzentration von 10000 pro ml. Die ersten Versuchsreihen (1 - 5) wurden mit diesen Konzentrationen an Tumorzellen durchgeführt. Anschließend wurde in den Versuchen (6 - 8) eine Reduktion der Tumorzellen im Versuchsansatz durchgeführt. Der Ansatz enthielt dann Tumorzellkonzentrationen von 7222/ml, 1667/ml und 167/ml in der Ausgangssuspension. Die Reduktion der anfänglich hohen Tumorzellzahl erfolgte, um die Nachweismethoden für Osteosarkomzellen auch bei geringeren Konzentrationen beurteilen zu können. Nach dem Aufbereiten der Suspension durch das Autotransfusionsgerät wurden die gewonnenen Bluteinheiten durch einen handelsüblichen Leukozyten-Depletionsfilter gefiltert. Diese Filter werden auch als Adsorptions- oder Membranfilter bezeichnet.

Erst nach sorgfältigem Durchmischen von Versuchsansatz, aufbereitetem MAT-Blut und gefiltertem MAT wurden Proben entnommen. Die Proben wurden bei unserer Untersuchung dem Versuchsansatz sowohl vor als auch nach der Aufbereitung mit der MAT und ebenso nach der Filtration durch den Leukozyten-Depletionsfilter entnommen. Es wurden drei validierte Nachweismethoden auf Osteosarkomzellen hin gewählt.

Unabhängig voneinander wurden die Proben untersucht. Die Sensitivität der Nachweismethoden prüften wir in einer Verdünnungsreihe. Die Vimentinexpression und die DNA-Analyse konnten auch bis zur Tumorzellkonzentration von 167/ml in der Ausgangssuspension einen positiven Osteosarkomzellnachweis liefern. Bei der modifizierten Klassifikation nach Papanicolaou hingegen war bei dieser Tumorzellkonzentration kein Tumorzellnachweis mehr möglich.

Die untere Nachweisgrenze für Osteosarkomzellen unserer Untersuchungsmethoden war nicht genau zu bestimmen, da nicht das gesamte Erythrozytenkonzentrat auf Tumorzellen hin untersucht werden konnte.

Die Kapazitätsgrenze eines Leukozyten-Depletionsfilters wurde auch mit hohen Tumorzellkonzentrationen bei uns nicht erreicht. Eine Analyse der Tumorzellen in den Filtersystemen durch eine histologische Technik erfolgte nicht. Weiterhin ist die mögliche Interaktion eines gelagerten und mit Stabilisator versetzten Erythrozytenkonzentrates in Suspension mit den Tumorzellen nicht bekannt.

In den Proben nach der Filterpassage konnten mit allen drei Nachweisverfahren keine Tumorzellen mehr nachgewiesen werden.

5.2 Risiken der homologen Transfusion:

Die Therapie mit einer homologen Bluttransfusion ist mit einem nicht zu unterschätzenden Risiko für alle transfusionspflichtigen Patienten verbunden, insbesondere aber auch für Tumorpatienten. Nach Daten von Friedmann et al. 1974 [29] erhielten unter den gesamten hospitalisierten Patienten in den USA 4,5% Bluttransfusionen, wobei Erkrankungen an malignen Neoplasien mit ungefähr 20% zu den häufigsten Transfusionsindikationen zählten. So ist der Bedarf an autologen Blutprodukten auch bei Tumoroperationen mit den bekannten Risiken der homologen Transfusion im Hinblick auf eine Infektionsübertragung gestiegen [3, 16, 31, 32, 33, 91]. Voroperationen und vorhergehende Transfusionen haben bei Tumorpatienten häufig zu einer Sensibilisierung geführt und somit das Risiko einer Inkompatibilität erhöht [27]. Vor allem aber die immunsuppressiven Effekte einer homologen Transfusion komplizieren den Krankheitsverlauf bei Patienten, die an Malignomen erkrankt sind, wenn mit homologen Blutprodukten therapiert wird. Gerade bei Tumorpatienten ist die Beeinträchtigung der Immunabwehr aber als kritisch für den Verlauf der Grunderkrankung anzusehen, denn schon Operationen und Allgemeinanaesthesien wirken sich messbar negativ auf die Immunabwehr aus [64].

Die Immunsuppression durch homologe Transfusionen wird kontrovers beurteilt. Schon seit längerem ist ein positiver Effekt mit einer verlängerten Transplantatüberlebenszeit bei Nierentransplantationen nach homologen Bluttransfusionen bekannt [81].

Bruson et al. [15] beschreiben detailliert Vorgänge, welche die Immunreaktionen nach homologen Transfusionen beeinflussen: Die unspezifische Immunsuppression lässt sich an einem Abfall des Quotienten der T-Helferzellen und der T-Suppressorzellen sowie an einer Funktionseinschränkung der Granulozyten erkennen. Als Ursache für diese Effekte wird eine verminderte Interleukin-2-Produktion bei einer gesteigerten Prostaglandin-E2-Synthese angenommen. Das von den T-Helferzellen produzierte Interleukin-2 ist für viele Vorgänge bei der Immunantwort Voraussetzung. Dagegen hemmt Prostaglandin-E2 die Antigenpräsentation der Makrophagen und reduziert die Freisetzung von Interleukin-2. Damit beeinträchtigt es die Immunantwort der Targetzellen. Zur spezifischen Immunsuppression führen nachgewiesene blockierende und anti-idiotypische Antikörper, die über mehrere Monate hinweg auftreten.

In einer großen retrospektiven Studie von Agarwal et al. [1] zeigte sich eine signifikant erhöhte Infektionsrate bei den mit homologen Blutprodukten behandelten Patienten, die

darüber hinaus noch mit der Anzahl der transfundierten Bluteinheiten korrelierte. Jensen et al. [55] stellten in einer prospektiven Studie bei elektiven Dickdarmeingriffen eine erhöhte Infektanfälligkeit bei den mit homologen Erythrozytenkonzentraten behandelten Patienten fest, während Patienten, die mit leukozyten- und thrombozytenfreien Blutprodukten versorgt wurden, sich bezüglich der Infektionshäufigkeit nicht von Patienten unterschieden, die nicht transfusionspflichtig waren. Ein ebenfalls erhöhtes perioperatives Infektionsrisiko zeigte sich bei transfusionspflichtigen Patienten, die homologe Bluttransfusionen erhielten, im Vergleich zu Patienten, die nach Eigenblutspenden mit autologen Transfusionen versorgt wurden [43, 103]. Boileau et al. [11] beschrieben, wie homologe Transfusionen die laborchemischen Werte der Immunfunktion negativ beeinflussen. Patienten, die ausschließlich mit autologen Blutprodukten versorgt werden konnten, zeigten keine Unterschiede zu einer nicht transfusionspflichtigen Patientengruppe.

In vielen klinischen Studien wurde die vermutete Immunmodulation in Bezug auf das Auftreten perioperativer Infektionen sowie ihre Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf bei Tumorerkrankungen bestätigt [52, 54, 65, 69, 70, 71, 72, 75, 86, 96].

In wieweit die Immunsuppression sich auf eine klinisch relevante Beeinflussung der körperlichen Tumorabwehr auswirkt, ist unklar. In mehreren retrospektiven Untersuchungen wurde die Frequenz von Rezidiverkrankungen und die Fünfjahresüberlebenszeit von Patienten, die eine Fremdbluttransfusion benötigten, mit der von nicht transfusionspflichtigen Patienten verglichen. Hierbei wird die homologe Transfusion als ein prognostisch ungünstiger Faktor bei Karzinomen des Rektums und bei urologischen Karzinomen gewertet [6, 7, 18, 42].

In einer prospektiven Studie mit insgesamt 423 Patienten wurden 216 Patienten mit homologen Blutprodukten substituiert und 207 Patienten mit autologen Transfusionen behandelt. In dieser Untersuchung fanden Bush et al. [19] hingegen ein identisches Auftreten von Rezidiverkrankungen und keine Unterschiede hinsichtlich der Fünfjahresüberlebenszeit.

Übersichtsarbeiten und Metaanalysen spiegeln diese kontroversen Daten bezüglich der Effekte von homologen Bluttransfusionen wider [6, 7, 8, 28, 80, 92, 104, 105, 110].

In einer experimentellen Untersuchung fanden Clarke et al. [22] nach homologen Transfusionen ein häufigeres Auftreten von Metastasen, wohingegen sie kein schnelleres Tumorwachstum nachweisen konnten. Andere experimentelle Studien lassen eine

Immunsuppression oder ein verstärktes Tumorwachstum schon nach größeren Blutverlusten vermuten [50, 98].

5.3 Der Einsatz der fremdblutsparenden Verfahren in der Tumorchirurgie:

Um fremdblutsparende Verfahren in der Tumorchirurgie einsetzen zu können, müssen die speziellen Indikationen und die Besonderheiten dieser Patienten berücksichtigt werden.

Das von W. Schleinzer und H.-H. Mehrkens beschriebene Gesamtkonzept zur Vorgehensweise zur Fremdbluteinsparung bei Operationen als "Autologes Transfusionskonzept Ulm" erläutert die Kombination der unterschiedlichen fremdblutsparenden Verfahren nach Operationsarten in den unterschiedlichen Kliniken [95]. Das Vorgehen bei Operationen an soliden Tumoren wird nicht diskutiert. Da jedoch Operationen bei Tumorerkrankungen in einem erhöhten Maße auch intraoperativ zu einem transfusionspflichtigen Zustand führen, ist die Möglichkeit, fremdblutsparende Verfahren in der Tumorchirurgie einzusetzen, von enormer Wichtigkeit. Genau sollten die einzelnen Indikationen und Kontraindikationen bewertet werden.

Zu dem Konzept der fremdblutsparenden Verfahren zählen die präoperative Eigenblutspende, die präoperative Plasmapherese, die präoperative normovolämische Hämodilution sowie die intra- und postoperative maschinelle Autotransfusion.

5.3.1 Präoperative Eigenblutspendeverfahren bei Tumoroperationen:

Um den Einsatz der präoperativen Eigenblutspendeverfahren bei Tumoroperationen durchzuführen, muss zum einen der präoperative Zustand der Patienten und zum anderen die zügige Terminplanung der Operation beachtet werden. Ein möglicher Algorithmus für Tumorpatienten ist an eine enge Kooperation aller Abteilungen gebunden. Bei bekannter Operationsplanung sollte der voraussichtliche Blutverlust nach den manifesten Erkrankungsstadien und den klinikspezifischen Daten abgeschätzt werden können. Des Weiteren sind bei einem solchen Konzept einheitliche Interventionsgrenzen im Hinblick

auf den einzelnen Patienten und die Therapieziele durch alle an der Behandlung beteiligten Ärzte zu diskutieren [59, 62, 99].

Eigenblutspendeprogramme werden jedoch wegen des drängenden Operationstermins, wegen des häufig eingeschränkten Allgemeinzustandes und aufgrund bestehender Kontraindikationen, wie z.B. einer Tumoranämie, nicht regelmäßig bei Patienten vor Operationen solider Tumore angewandt [68].

Harrison et al. [40] versuchten bei Patienten mit Tumoren des Kolons und des Rektums präoperative Eigenblutspenden durchzuführen, um den Fremdblutbedarf zu reduzieren. Von 129 Patienten mussten bei dieser Untersuchung 101 von der Eigenblutspende jedoch schon ausgeschlossen werden. Der Ausschluss erfolgte am häufigsten aufgrund einer Anämie bei ischämischer Herzerkrankung. Bei 17 Patienten konnte aufgrund von administrativen Problemen keine Spende durchgeführt werden. Es wird auf den großen organisatorische Aufwand bei Patienten hingewiesen, die einerseits auf den baldmöglichsten Operationstermin warten, andererseits aber nur zu 25% effektiv spendetauglich sind. Lediglich 30% der Patienten konnten hier ausschließlich mit Eigenblut versorgt werden. 50% der Eigenblutkonserven wurden jedoch nicht benötigt und mussten verworfen werden. Die ungenügende Kalkulation des Blutverlustes und die dadurch unsicheren Aussagen zum Transfusionsbedarf stellen das Problem einer effektiven Eigenblutspende dar. Jaffray indizierte eine Zuordnung jeder Operationsart, auch Operationen an Neoplasien, einer möglicher Eigenblutspende [53].

In einer prospektiven Studie führten Heiss et al. [44] Tumorpatienten einem Eigenblutspendeprogramm zu. Aus einem Kollektiv von 520 Patienten waren 120 Patienten laut Protokoll spendefähig, also 23%. Diese wurden in eine Eigenblutgruppe und in eine Kontrollgruppe randomisiert. In diesem Programm wurden den Eigenblutspendepatienten je 2 Einheiten Blut am 10. und am 7. präoperativen Tag entnommen. Patientendaten, Erkrankungsstadien und Operationsverfahren zeigten keine Unterschiede. In der Eigenblutgruppe kam es zu einem häufigeren Transfusionsbedarf, doch waren bei diesen Patienten signifikant weniger postoperative infektiöse Komplikationen zu beobachten, 12% in der Eigenblutgruppe versus 27% in der Kontrollgruppe. Es war bei 9% der Eigenblutpatienten keine Transfusion erforderlich, in der Kontrollgruppe benötigten 40% keine Transfusion. In der Eigenblutgruppe benötigten 35% der Patienten zusätzlich auch homologe Erythrozytenkonzentrate. Die Auswirkungen der Transfusionen auf die Tumorerkrankung konnten nicht schlüssig beantwortet werden,

jedoch beschrieben Heiss et al. einen Trend zu einer verlängerten tumorfreien Überlebenszeit. In einer weiteren Studie von Hoyneck van Papendrecht et al. benötigten die Patienten, die in ein Eigenblutspendeprogramm aufgenommen waren, nur noch zu 15% homologe Blutprodukte [51]. Eine weitere Ausdehnung des präoperativen Zeitraumes zur möglichen Vergrößerung des autologen Blutvorrates lehnen die Autoren aber vor allem mit Rücksicht auf die psychische Belastung der Tumorkranken ab.

5.3.2 Maschinelle Autotransfusion in der Tumorchirurgie:

Der Vorteil der maschinellen Autotransfusion liegt in der Verfügbarkeit solcher Geräte praktisch in allen Operationsbereichen. Bei der maschinellen Autotransfusion wird primär mit Operationsbeginn das mittels einer Doppellumensaugleitung antikoagulierte Wundblut in das Reservoir des Autotransfusionssystems gesammelt. Alternativ kann bei Operationen das Wundblut auch in einen sterilen Auffangbehälter gesammelt werden. Die maschinelle Autotransfusion wird dann erst bei Erreichen des Mindestvolumens zur Aufbereitung eines Systems eingesetzt und das antikoagulierte Wundblut steril in das Autotransfusionssystem überführt. Dem aktuellen Blutverlust kann jederzeit Rechnung getragen werden und Wundblut nach Vorbereitung des Systems aufbereitet werden. Im heutigen Routineeinsatz befinden sich fast ausschließlich Geräte, die eine Zentrifugation, einen Waschvorgang und einen Konzentrationsvorgang manuell oder automatisch ermöglichen. Der Aufbereitungsprozess beginnt mit einer Passage eines Grobfilters (200 µm Porengröße) im Reservoirbehälter, in dem Gewebereste und Blutkoagel abfiltriert werden. Anschließend werden in der Zentrifugenglocke aus jeweils ungefähr einem Liter Wundblut die Erythrozyten nach dem Prinzip der Differentialzentrifugation abgetrennt. Nach einem Waschvorgang mit isotonischer Kochsalzlösung können die Erythrozyten durch Zentrifugation nochmals konzentriert werden und stehen nach Überführung in einen Einmalbeutel zur Retransfusion zur Verfügung. Die Herstellung eines Erythrozytenkonzentrates benötigt etwa einen Zeitraum von fünf Minuten. Währenddessen kann durch die Absaugeinheit kontinuierlich weiteres Wundblut gesammelt werden. Bei den aufbereiteten Erythrozyten ist eine gute Überlebensfähigkeit und eine gute Funktion nachgewiesen worden [84].

Studien zur Qualität der mit der maschinellen Autotransfusion aufbereiteten Erythrozytenkonzentrate belegen eine Elimination von bedenklichen Mengen an Antikoagulans, Zelldetritus, freiem Hämoglobin und auch an Antibiotika [74, 76, 83]. Die Elimination von körpereigenem entemulgiertem Fett gilt als schwierig. Es wird versucht, mittels Mikrofiltration die Fettpartikel zu entfernen. Da die Größenordnung der Fettpartikel in einen Bereich von bis zu 5µm liegt, ist dies nicht vollständig möglich. Erst eine neue Generation von Autotransfusionssystemen mit einem kontinuierlichen Wasch- und Separationsvorgang zeigten hier bei orthopädischen Operationen bessere Ergebnisse [12].

Der Einsatz der intra- oder postoperativen maschinellen Autotransfusion kann eine deutliche Einsparung an Fremdblut ermöglichen. Dies kann mit geringem Aufwand routinemäßig und vor allem blutverlustabhängig geschehen. So hat sich dieses Verfahren vor allem bei orthopädischen, herzchirurgischen und gefäßchirurgischen Eingriffen etabliert [5, 85]. Bei Operationen in infizierten Wundgebieten jedoch oder bei abdominalchirurgischen Eingriffen, hier insbesondere bei der Colonchirurgie, wird regelmäßig eine bakterielle Kontamination des Wundblutes nachgewiesen. Durch die maschinelle Autotransfusion wird das gesammelte Wundblut von einer bakteriellen Kontamination nicht gereinigt und deshalb besteht eine Kontraindikation für den Einsatz der maschinellen Autotransfusion bei allen septischen Eingriffen [26, 48, 56, 73].

Die maschinelle Autotransfusion wurde trotz möglicher Tumorzellkontamination auch in klinischen Studien in der Tumorchirurgie eingesetzt [41, 60, 61, 89, 111]. In diesen Studien wurde den Patienten das maschinell aufbereitete Blut aus dem Operationsgebiet von Operationen bei urologischen Tumoren und bei Lebertumoren retransfundiert. Postoperativ wurden die Patienten im Rahmen einer vierteljährlichen Nachsorgeuntersuchung beobachtet. Diese Autoren fanden im Vergleich zu homologen Bluttransfusionen bei ihren Patientengruppen gleiche Raten an Rezidivkrankungen und keine erniedrigten Überlebenszeiten. Hieraus schlossen die Autoren, dass die maschinelle Autotransfusion auch bei Tumoroperationen eingesetzt werden kann. Das schwerwiegende Risiko einer Tumorzellverschleppung kann mit diesen Studien jedoch nicht hinreichend widerlegt werden.

Es besteht eine absolute Kontraindikation für die maschinelle Autotransfusion bei tumorchirurgischen Eingriffen, da hier die Gefahr einer systemischen Tumorzellaussaat

besteht, wenn die Tumorzellen aus dem Wundblut nicht sicher eliminiert werden können [2, 25].

Diese Kontraindikation leitet sich aus dem Nachweis von Tumorzellen in dem Wundblut im Rahmen der Tumorchirurgie ab. Nachdem Yaw 1975 von Tumorzellen im Wundblut bei der Operation eines fortgeschrittenen Bronchialkarzinoms berichtet hatte, wurde der Einsatz der maschinellen Autotransfusion in der Tumorchirurgie wegen der möglichen Dissemination von Tumorzellen abgelehnt [109]. Er demonstrierte den Fall eines an einem fortgeschrittenen Bronchialkarzinom mit persistierender Hämoptoe erkrankten Mannes, dessen Wundblut während der Thorakotomie gesammelt wurde. In der anschließenden zytologischen Untersuchung wurden sowohl vor als auch nach der Passage durch ein Autotransfusionsgerät Tumorzellen sicher identifiziert.

Hansen et al. fanden bei quantitativen Untersuchungen mittels spezifischer Dichtezentrifugation und Zytozentrifugation Tumorzellen im Wundblut bei 57 von 61 Patienten. Diese Patienten wurden an abdominellen, orthopädischen, urologischen und gynäkologischen Tumoren und an Malignomen im Kopf- und Halsbereich operiert. Die Konzentrationen der nachgewiesenen Tumorzellen im gesammelten Wundblut lagen bei 60/100ml bis 4000 Tumorzellen/ml. Es fand sich keine Korrelation zum gesamten Blutverlust, der zwischen 50 und 3000 ml lag. Bei 26% der Patienten waren intraoperativ auch im zentralvenösen Blut zirkulierende Tumorzellen mit einer Anzahl von bis zu 12 Tumorzellen pro 20 ml nachweisbar [38].

Die oben genannten Tumorzellkonzentrationen im Wundblut waren mitbestimmend für die Konzentrationen der Osteosarkomzellen in der Ausgangssuspension unserer Untersuchung. Eine mögliche Elimination der Tumorzellen im Wundblut während der maschinellen Autotransfusion wurde auch quantitativ untersucht. Homann et al. fanden nach fünffacher Passage von Tumorzellsuspensionen aus Zellkulturen durch ein Autotransfusionsgerät eine Reduktion der anfänglichen Tumorzellen um 97% [49]. Diese malignen Zellen waren oftmals in ihrer Vitalität gemindert, aber doch in der Lage, sich zu teilen und Metastasen zu bilden.

Weitere in vitro-Untersuchungen zur Tumorzellelimination durch die maschinelle Autotransfusion mit radioaktiv markierten Tumorzellen zeigten lediglich reduzierte Aktivitäten in dem aufbereiteten Blut. Diese Ergebnisse implizieren ebenfalls eine Tumorzellkontamination des aufbereiteten Blutes [23, 46].

Eine weitere Arbeitsgruppe konnte durch den Einsatz eines speziellen Autotransfusionsgerätes mit Dichtezentrifugation bei einer Rückhalterate von 50%

ebenfalls nicht alle Tumorzellen entfernen. Die Autoren fanden einen hohen Anteil an morphologisch geschädigten Tumorzellen und diskutierten ebenfalls die Gefahr einer Tumorzellverschleppung [57]. Diese Ergebnisse mit nachweisbaren Tumorzellen im maschinell aufbereiteten Blut bestätigen alle die Kontraindikation zur Retransfusion.

5.3.3 Elimination von Tumorzellen durch die maschinelle Autotransfusion mit Bestrahlung des Erythrozytenkonzentrates:

Hansen et al. [37] versuchten durch die Bestrahlung der mittels maschineller Autotransfusion aus dem Wundblut von Tumoroperationen gewonnenen Erythrozytenkonzentrate alle Tumorzellen zu inaktivieren. Die Messung der Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen ergab Werte zwischen 1 und 2 Gray. Als geeignetes Verfahren nannten die Verfasser eine Bestrahlung des aufbereiteten und filtrierten Blutes mit 50 Gray durch ein Blutbestrahlungsgerät. Diese Dosis soll ausreichen, die Koloniebildungsrate um mindestens 9 Zehnerpotenzen zu reduzieren, so dass bei 10^7 Zellen mit Sicherheit keine Teilungsaktivität der Tumorzellen mehr vorhanden wäre [20]. Die Bestrahlung von Blutbestandteilen wird schon seit längerem in der klinischen Routine zur Vermeidung einer Graft-versus-Host Erkrankung eingesetzt. Die kernlosen Erythrozyten werden bei einer Dosis von 50 Gray nicht geschädigt. Nach einer Bestrahlung von Blutkonserven ist lediglich ein Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration beobachtet worden [94]. Bei diesem Vorgang handelt es sich um ein reversibles Geschehen, welches nur kleine Schwankungen zeigt und nur bei Neugeborenen von klinischer Relevanz ist [14, 24]. Als Therapieempfehlung zur Retransfusion von aufbereitetem Wundblut bei tumorchirurgischen Eingriffen geben die Autoren bei allen Tumorarten diese Vorgehensweise an [39]. Als Voraussetzung für dieses Verfahren muss die Infrastruktur zur Blutbestrahlung geschaffen und unterhalten werden. Wenn keine separate Blutbestrahlungseinheit zur Verfügung steht, muss mit einer Strahlenklinik die Logistik vereinbart werden. Die Zeitspanne bis zur Retransfusion ist lang, insbesondere wenn das aufbereitete Erythrozytenkonzentrat zu einer externen Bestrahlungseinheit gebracht werden muss. Ein akuter Blutverlust lässt sich bei dieser Methode nicht ausgleichen. Die Gefahr einer möglichen Verwechslung des Erythrozytenkonzentrates sowie hoher materieller und personeller Aufwand grenzen dieses Vorgehen ein.

5.3.4 Elimination von Tumorzellen durch den Einsatz von Porenfiltern:

Im Rahmen von weiteren klinischen Untersuchungen wurde versucht, Tumorzellen durch Porenfilter zu eliminieren. Klimberg et al. untersuchten Patienten mit urologischen Tumoren, bei denen das maschinell aufbereitete Wundblut nach der Filtration durch einen Filter mit einer Porengröße von 24 μm retransfundiert wurde. Sie fanden im Vergleich mit Daten aus der Literatur, in denen solche Patienten mit homologen Blutprodukten behandelt wurden, vergleichbare Krankheitsverläufe [61]. Fujimoto et al. untersuchten 52 Patienten nach Resektion von hepatozellulären Karzinomen, die mit Eigenblut und maschinell aufbereitetem und filtriertem Wundblut transfundiert wurden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Rezidivrate und bei der Überlebensrate im Vergleich zu den 50 Patienten der Kontrollgruppe [30]. Fujimoto relativiert die mögliche Gefahr der Retransfusion von Tumorzellen, da zirkulierende Tumorzellen häufig nachgewiesen werden und hohe Zellzahlen nötig sind, um eine Metastase zu induzieren.

Auch Hart et al. filtrierten das maschinell aufbereitete Wundblut bei Operationen zur radikalen Zystektomie bei Blasenkarzinomen durch einen Porenfilter mit einer Porengröße von 20 μm , bevor sie es transfundierten. Im Mittel wurden 492 ml maschinell aufbereitetes Blut transfundiert. Sie kamen aufgrund von Nachbeobachtungen zu dem Schluss, dass die maschinelle Autotransfusion in diesem Bereich relativ sicher eingesetzt werden kann. Eine diffuse Metastasierung wurde in den 33 beschriebenen Verläufen nicht beobachtet und die Krankheitsverläufe unterschieden sich nicht von denen ihrer anderen Patienten [41].

Harrison et al. haben darauf hingewiesen, dass ausgehend von einer 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 40% eine Studie mindestens 1000 Patienten umfassen müsste, um eine Veränderung der Überlebensrate um 10% mit statistischer Signifikanz nachweisen zu können. Bei anderen Transfusionsrisiken mit einer Risikorate von 1:40000, wie zum Beispiel bei der Hepatitis B, wäre es unverständlich, ein Metastasierungsrisiko von 1:100 nicht ernst zu nehmen [40]. Die Unbedenklichkeit dieser Therapie mit aufbereitetem Wundblut kann bei den Fallzahlen dieser Studien und der beschränkten Nachbeobachtungszeiten nicht übernommen werden.

Die mögliche Elimination von Tumorzellen durch Porenfilter ist kritisch zu sehen. Bei einer mittleren Porengröße, die auch nur annähernd im Größenbereich der Tumorzellen liegt, ist bei vitalen und deformierbaren Tumorzellen keine sichere Separation zu erreichen. Miller et al. [78] haben mikroskopisch Tumorzellen nach der Filtration mit einem Porenfilter von 40 μm nachweisen können. In Vorversuchen zeigte sich, dass sich

auch Osteosarkomzellen mit einer Größe von 12 – 19 µm sich nicht durch einen Filter mit einer Porengröße von 10 µm abtrennen lassen [79].

5.3.5.1 Elimination von Tumorzellen durch den Einsatz von Leukozyten-Depletionsfiltern:

Obwohl Leukozyten-Depletionsfilter bezüglich ihres eigentlichen Einsatzgebietes keine komplette Elimination der weißen Blutkörperchen, sondern lediglich eine definierte Reduktion in der Größenordnung von 3 bis 4 Zehnerpotenzen bewirken [47, 90], wurden diese Filter von mehreren Arbeitsgruppen zur Elimination von Tumorzellen geprüft [35, 78, 87, 107]. Hierbei wurden fast ausschließlich Tumore epithelialer Herkunft untersucht, so dass über die Eliminationsleistung dieser Filter bei mesenchymalen Tumoren nur spärliche Informationen vorliegen.

Miller et al. [78] erörterten in einer Arbeit aus dem Jahre 1991 die Möglichkeit der Separation einer definierten Anzahl von Tumorzellen aus den Zellkulturen eines Lungenkarzinoms (SKBr3), eines Kolonkarzinoms (COLO 320), eines Burkitt Lymphoms (Daudi) und eines Erythroblastoms (K562). Nach der Inokulation mit Vollblut und der Aufbereitung mit einem Autotransfusionsgerät wurden die gewonnenen Erythrozytenkonzentrate und der Zentrifugationsabwurf samt der Spülflüssigkeit untersucht. Es wurden Zentrifugate aus jeweils 50-ml-Proben hergestellt. Diese wurden mittels Mikroskop und Zellkultur auf Tumorzellen hin untersucht. Das mit den Bronchialkarzinomzellen und Kolonkarzinomzellen versetzte Blut wurde im Anschluss durch einen Porenfilter mit einer Porengröße von 40 µm (SQ40S) und in einer anderen Versuchsreihe durch einen Leukozyten-Depletionsfilter (RC100) gefiltert. Beide Nachweisverfahren zeigten bei allen aufbereiteten Erythrozytenkonzentraten vor und nach der Passage des Porenfilters positive Ergebnisse. Der Nachweis von Tumorzellen gelang jedoch nicht bei den durch Leukozyten-Depletionsfiltern gefilterten Blutprodukten.

Mit einer ähnlichen Versuchsanordnung und einer radioaktiven Markierungstechnik konnten Wiesel et al. [106] bei urologischen Tumorzellen aus Zellkulturen nur noch eine Restaktivität in Höhe der Hintergrundstrahlung nachweisen. Sie schlossen daraus auf eine vollständige Tumorzellelimination. In einer klinischen Untersuchung dieser Autoren

wurden in Blutproben aus einem zentralen Venenkatheter sowohl präoperativ als auch postoperativ mittels Zellkulturen, Immunfluoreszenzfärbung sowie Nachweis auf Prostataspezifisches Antigen in allen 22 beobachteten Fällen Tumorzellen nachgewiesen. Dagegen waren im maschinell aufbereiteten und anschließend durch einen Leukozyten-Depletionsfilter filtrierten Wundblut nur noch in einem der beobachteten Fälle Tumorzellen nachzuweisen.

5.3.5.2 Elimination von Osteosarkomzellen:

In der vorliegenden in vitro-Studie galt es, die Frage zu klären, ob es möglich ist, angezüchtete Osteosarkomzellen in Suspension mit einem Erythrozytenkonzentrat und einer kristalloiden Lösung mittels maschineller Autotransfusion und eines nachgeschalteten Leukozyten-Depletionsfilters zu eliminieren. Die Versuchsanordnung wurde in dieser Form gewählt, um sie in der Klinik bei Operationen an Osteosarkomen nachstellen zu können. Auch dort würde Wundblut in dem Reservoir oder in einem sterilen Auffangbehälter zusammen mit einem Antikoagulans und einer kristalloiden Lösung primär gesammelt. Auf die Zugabe von Heparin und anderen im Wundblut sicher vorhandenen Partikel wurde im Versuchsansatz verzichtet.

Mit den von uns verwendeten Nachweismethoden ließen sich nach der Filterpassage keine Osteosarkomzellen mehr nachweisen.

In allen Proben aus den maschinell aufbereiteten Bluteinheiten ließen sich vor Passage der Leukozyten-Depletionsfilter Osteosarkomzellen nachweisen. Erst die Passage durch den Filter bewirkte eine Tumorzellelimination, nicht jedoch die alleinige Wiederaufarbeitung im Autotransfusionsgerät mit dem Zentrifugations- und Waschvorgang [79]. Die Versuchsergebnisse bestätigen in diesem Punkt die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen [23, 78].

Im Vergleich mit den in der Literatur angegebenen Tumorzellkonzentrationen im Wundblut liegen dort die Zahlen im Bereich von 0,2 bis 4000/ml. In unseren Versuchsreihen eins bis fünf finden sich sogar 2,5fach höhere Osteosarkomzellkonzentrationen, während in den Versuchsansätzen sechs bis acht Konzentrationen vorliegen, die in dem aus der Literatur bekannten Bereich liegen.

Obwohl in der vorliegenden Untersuchung mit drei unabhängigen Nachweisverfahren keine Tumorzellen im filtrierten Blut nachgewiesen werden konnten, muss bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass Tumorzellen aus Zellkulturen an künstliche Oberflächen gewöhnt sind und ein besonderes Adhäsionsverhalten gegenüber Leukozyten-Depletionsfilter besitzen können [93]. Ob ein mesenchymaler Tumor auch ein anderes Adhäsionsverhalten an Adsorptionsfiltern hat, ist bisher nicht bekannt.

Auch war es uns in diesem Versuchsaufbau nicht möglich, den genauen Grenzwert unserer Nachweismethoden für Osteosarkomzellen zu bestimmen. Eine unbekannte Größe ist weiterhin die möglicherweise endliche Kapazität für Osteosarkomzellen, die ein Leukozyten-Depletionsfilter dieser Bauart eliminieren kann. Diese Kapazitätsgrenze wurde auch mit hohen Osteosarkomzellkonzentrationen in unseren Untersuchungen bei einmaliger Verwendung der Filter nicht erreicht.

Diese Resultate mit einer kompletten Elimination der Osteosarkomzellen aus dem aufbereiteten Wundblut stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Hansen et al., die ihre Versuche aber mit Tumorzellen epithelialer Herkunft durchführten [35]. Diese Arbeitsgruppe trennte Tumorzellen aus dem Wundblut von transfusionsrelevanten tumorchirurgischen Eingriffen ab. Die Trennung der Tumorzellen und Blutzellen erfolgte aufgrund ihres unterschiedlichen spezifischen Gewichtes durch die Dichtezentrifugation nach der Herstellung des Erythrozytenkonzentrates durch die maschinelle Autotransfusion. Dabei sedimentieren die Partikel oder Zellen in einem Medium zunehmender Dichte so weit, bis sie die gleiche spezifische Dichte wie das Medium an diesem Ort haben. Für eine Optimierung der Trennmethode wurde die spezifische Dichte für jede Tumorzellart in einem kontinuierlichen Gradienten bestimmt und der Einstufengradient nach diesem Ergebnis ausgerichtet. Voraussetzung für eine solche Dichtezentrifugation muss ein homogener Tumor sein, wie er in Zellkulturen vorkommt. Ob diese Methode auch auf Tumorzellen und Tumorzellkonglomerate aus Operationen angewendet werden kann, bleibt unklar. Nach Abtrennung der Tumorzellen wurde die Suspension mittels Zytozentrifugation angereichert. Die Arbeitsgruppe um Hansen untersuchte in Portionen von jeweils 50ml das gesamte Wundblut und auch das ganze Erythrozytenkonzentrat nach der Aufbereitung mit der maschinellen Autotransfusion. Die von den Autoren angegebene Nachweisgrenze lag bei 10 Tumorzellen pro 500ml Blut. Somit war es dieser Arbeitsgruppe möglich, die Rückhalteraten unterschiedlicher Leukozyten-Depletionsfilter für die Tumorzellen zu bestimmen. Sie untersuchten Zellen aus etablierten Zelllinien (Urothel-, Ovarial-, Melanom-, Prostata-, Mamma- und Kolonkarzinom), aus

Primärkulturen von im Wundblut vorhandenen Tumorzellen (Magen- und Ovarialkarzinom), aus soliden Tumoren (Schilddrüsen-, Magen-, Kolon-, Rektum-, Nierenzell-, Prostata-, Ovarial- und Endometriumskarzinom und eines Melanoms) sowie auch Zellen aus dem Wundblut selbst. In 53 der 55 Fälle konnten im Wundblut, das ein Volumen zwischen 100-3000 ml hatte, Tumorzellen in einer Anzahl von 10 bis 10^7 bestimmt werden.

Die Rückhalterate der Leukozyten-Depletionsfilter bei Tumorzellen aus etablierten Zelllinien lag im Median etwa bei 4 Zehnerpotenzen, für Tumorzellen aus Primärkulturen von Wundblut lag der Median der Rückhalterate bei etwa 3 und für Zellen aus Primärkulturen war der Median der Rückhalterate ebenfalls bei etwa 3 Zehnerpotenzen. Zwischen den verschiedenen Leukozyten-Depletionsfiltern konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Eliminationsleistung für Tumorzellen festgestellt werden. Die im filtrierten Wundblut nachgewiesenen Tumorzellen waren vital, teilungsfähig und in der Lage, im Tiermodell Tumore zu bilden. Eine vollständige Elimination der Tumorzellen war in der genannten Studie nicht immer möglich, es erfolgte lediglich eine definierte Reduktion durch die Passage des Leukozyten-Depletionsfilters [39].

Unsere Untersuchungen deuten darauf hin, dass eine hinreichende Absicherung gegen eine Tumorzellkontamination erreicht wird, wenn gesammeltes und antikoaguliertes Wundblut aus Operationen eines Osteosarkoms mit maschineller Autotransfusion aufbereitet und mit einem Leukozyten-Depletionsfilter gefiltert wird. Die Vorteile gegenüber der Blutbestrahlung von aufbereitetem Wundblut ist die Unabhängigkeit von einer Blutbestrahlungseinheit oder einer Strahlenklinik. Die Filtration ist eigenhändig vom behandelnden Arzt ohne hohen technischen Aufwand durchführbar. Es bedarf keiner großen Logistik bei der Zusammenarbeit mehrerer Institute und des geplanten Bluttransports. Die Risiken einer Fehltransfusion sind geringer, da die Filtration bettseitig geschehen kann. Auch besteht bei Notfalltransfusionen oder bei Versorgungsproblemen mit Erythrozytenkonzentraten die Möglichkeit, kurzfristig den Patienten mit einem autologen Blutprodukt zu versorgen. Der materielle Aufwand bezüglich Lagerung und Kosten ist durch den Einsatz eines weiteren Filtersystems vergleichsweise gering.

5.4 Schlussfolgerung:

Obwohl in der vorliegenden Untersuchung mit drei unabhängigen Nachweisverfahren keine Tumorzellen im maschinell aufbereiteten und anschließend filtrierte Blut nachgewiesen werden konnten, muss bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass Tumorzellen aus Zellkulturen ein besonderes Adhäsionsverhalten gegenüber künstlichen Oberflächen besitzen können. Hansen et al. haben die Trenneigenschaft der Leukozyten-Depletionsfilter für Karzinomzellen aus dem Wundblut sowie aus soliden Tumoren untersucht [35]. Sie fanden mit einer Reduktionsrate von etwa 4 Zehnerpotenzen gegenüber einer Reduktionsrate von 3 Zehnerpotenzen eine höhere durchschnittliche Rückhalterate für Tumorzellen aus kultivierten Zelllinien gegenüber Tumorzellen aus Wundblut. Allerdings könnte die potentielle Filterpassage zu einer Selektion besonders vitaler Tumorzellen führen. Sato et al. haben dies in tierexperimentellen Untersuchungen für Porenfilter nachweisen können [93].

Die Filtration von aufbereitetem Wundblut durch einen Leukozyten-Depletionsfilter ist eine technisch einfach durchzuführende, kostengünstige Maßnahme. Es besteht keine Abhängigkeit von Blutbestrahlungseinheiten, die Durchführung ist mit keinem großen organisatorischen Aufwand verbunden. Der Zeitaufwand zur Durchführung der Transfusion ist im Vergleich zur Blutbestrahlung geringer und die Risiken einer Fehltransfusion sind minimiert, da alle Maßnahmen bettseitig durchgeführt werden können. Im Rahmen von Notfalltransfusionen, Massivtransfusionen und Versorgungsproblemen ist die Transfusion von MAT-Blut nach Filtration mit Leukozyten-Depletionsfilter eine praktikable Therapie bei Operationen von Osteosarkomen. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung deuten darauf hin, dass eine hinreichende Absicherung bezüglich einer Tumorzellaussaat besteht und im Sinne eines Heilversuchs in einer Notfallsituation auch so verfahren werden kann.

6 Zusammenfassung:

Fragestellung: Der Einsatz der maschinellen Autotransfusion (MAT) wird in der Tumorchirurgie wegen der Gefahr einer systemischen Tumorzellaussaat als kontraindiziert angesehen. Diese in vitro-Studie untersuchte, ob die MAT in Verbindung mit einem handelsüblichen Leukozyten-Depletionsfilter in der Lage ist, Osteosarkomzellen aus einer Suspension mit einem Erythrozytenkonzentrat zu eliminieren.

Material und Methoden: Eine definierte Menge aus Zellkulturen angezuchteter Osteosarkomzellen wurde jeweils mit einem Erythrozytenkonzentrat und Ringerlösung vermischt. Diese Versuchsansätze wurden mit einem maschinellen Autotransfusionssystem aufbereitet und anschließend durch einen handelsüblichen Leukozyten-Depletionsfilter gefiltert. Standardisierte Proben aus dem Versuchsansatz wurden sowohl vor als auch nach der Passage des Filters mittels Papanicolaou-Klassifikation, immunzytochemischem Nachweis (Vimentinexpression) und mit der DNA-Analyse auf Osteosarkomzellen hin untersucht.

Ergebnisse: Nach der maschinellen Aufbereitung im Autotransfusionsgerät und der Passage des Leukozyten-Depletionsfilters konnten mit den drei verwendeten Nachweisverfahren keine Osteosarkomzellen mehr in den Probenansätzen nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu wurden durch die alleinige Aufbereitung im Autotransfusionsgerät die Osteosarkomzellen nur unzureichend eliminiert. Die DNA-Analyse erwies sich im Vergleich zur Papanicolaou-Klassifikation und zur Immunzytochemie als das sensiblere Nachweisverfahren für Osteosarkomzellen.

Schlussfolgerung: Obwohl mit den verwendeten Nachweisverfahren keine Tumorzellen im filtrierten Blut mehr nachgewiesen werden konnten, muss bei der Beurteilung der Eliminationsleistung des Leukozyten-Depletionsfilters berücksichtigt werden, dass diese Filter in ihrem eigentlichen Einsatzgebiet lediglich eine definierte Zellreduktion bewirken.

Darüber hinaus können Tumorzellen aus Zellkulturen ein besonderes Adhäsionsverhalten gegenüber künstlichen Oberflächen aufweisen.

Die Filtration von aufbereitetem Wundblut durch einen Leukozyten-Depletionsfilter ist eine technisch einfach durchzuführende Maßnahme. Es besteht keine Abhängigkeit zu Blutbestrahlungseinheiten, die Durchführung ist mit keinem großen organisatorischen Aufwand verbunden, der Zeitaufwand für die Herstellung der Transfusion ist gering und die Risiken einer Fehltransfusion sind minimiert, da alle Maßnahmen bettseitig durchgeführt werden können. Im Rahmen von Notfalltransfusionen, Massivtransfusionen und Versorgungsproblemen ist die Transfusion von MAT-Blut nach Filtration mit Leukozyten-Depletionsfilter eine praktikable Therapie bei Operationen von Osteosarkomen. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung deuten darauf hin, dass eine hinreichende Absicherung bezüglich einer möglichen Tumorzellaussaat besteht und im Sinne eines Heilversuchs in einer Notfallsituation auch so verfahren werden kann.

Solange das genaue Verhalten von Osteosarkomzellen aus Wundblut bei Operationen zur Resektion von Osteosarkomen nicht sicher beurteilt werden kann und für den Einsatz der maschinellen Autotransfusion eine komplette Elimination von Tumorzellen gefordert werden muss, ist bisher aber keine Therapieempfehlung zur Retransfusion des aufbereiteten Wundblutes zu geben.

7 Literaturverzeichnis:

1. Agarwal N, Murphy J, Cayton C, Stahl W: Blood transfusion increases the risks of infection after trauma. *Arch Surg* 1993; 128: 171-177
2. Ahnefeld FW: Fremdblutsparende Methoden in der operativen Medizin. *Anaesthesiol Intensivmed* 1992; 33: 200-203
3. Biermann E: Aktuelle juristische Fragen im Zusammenhang mit Eigenblutspende und gerichteter Blutspende in Deutschland. *Infusionsther Transfusionsmed* 1994; 21(suppl): 6-11
4. Billiau A, Edy VG, Heremans H: Human interferon: mass production in a newly established cell line; MG 63. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; 12: 11-15
5. Blauhut B: Risiken und Nebenwirkungen der autologen Transfusion. *Beitr Infusionsther* 1991; 28: 287-289
6. Blumberg N, Heal J: Effects of transfusion on immune function. Cancer recurrence and infection. *Arch Pathol Lab Med* 1994; 118: 371-9
7. Blumberg N, Heal J: Transfusion and host defenses against cancer recurrence and infection. *Transfusion* 1989; 29: 236-245
8. Blumberg N, Triulzi D: Transfusion - induced immunomodulation and its clinical consequences. *Transfus Med Rev* 1990; 4: 24-35
9. Blümcke S: Pathologie. De Gruyter Berlin New York 1995: 756-757
10. Böcking A, Adler CP, Common HH, Hilgarth M, Granzen B, Auffermann W: Algorithm for a DNA-cytophotometric diagnosis and grading of malignancy. *Anal Quant Cytol Histol* 1984; 6: 1-8
11. Boileau S, Hoffmann S.: Comparative study of immunologic consequences of autotransfusion and homologous transfusion in lung cancer surgery. *Ann Fr Anesth Reanim* 1993;12(3): 251-259
12. Booke M, Fobker M, Fingerhut D, Storm M, Van Aken H: Fat elimination during intraoperative autotransfusion: an in vitro investigation. *Anesth Analg* 1997; 85: 959-962
13. Bormann von B: Blutsparende Verfahren - anästhesiologische Aspekte. *Unfallchir* 1989; 15: 194-200
14. Brugnara C, Churchill W: Effect of irradiation on red cell cation content and transport. *Transfusion* 1992; 32: 246-252

15. Brunson M, Alexandeur J: Mechanisms of transfusions-induced immunosuppression. *Transfusion* 1990; 30: 651-658
16. Bundesärztekammer: Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion (Hämotherapie). Deutscher Ärzte Verlag Köln 1996: 77-84
17. Burck H: *Histologische Technik*. Thieme Stuttgart NewYork 1988: 122-130
18. Burrows L, Tartter P: Effect of blood transfusion on colonic malignancy recurrence rate. *Lancet* 1982; 18: 662
19. Bush O, Hop W, Hoyneck-van Papendrecht M, Marquet R, Jeekel J: Blood transfusion and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1993; 328: 1372-1376
20. Button L, DeWolf W, Newburger P, Jacobson M, Kevvy S: The effects of irradiation on blood components. *Transfusion* 1981; 21: 419-426
21. Capdevila X, Calvet Y, Biboulet P, Biron C, Rubenovitch J, Athis F: Aprotinin decreases blood loss and homologous transfusions in patients undergoing major orthopedic surgery. *Anesthesiology* 1998; 88: 50-57
22. Clarke P, Tarin D: Effect of predeposit blood transfusion on tumor metastases. *Br J Surg* 1987; 74: 520-522
23. Dale RF, Kipling RM, Smith MF, Collier DS: Separation of malignant cells during autotransfusion. *Br J Surg* 1988; 75: 581
24. Davey R, McCoy N, Sullivan J, Spiegel D, Leitmann S: The effect of prestorage irradiation on posttransfusion red cell survival. *Transfusion* 1992; 32: 525-528
25. Dzik W, Sherburne B: Intraoperative blood salvage: Medical controversies. *Transfus Med Rev* 1990; 4: 208-235
26. Fink M, Schmidt R, Schneider W, Feine U: Die Qualität gewaschener autotransfundierter Erythrozyten. *Anaesthesist* 1986; 35: 686-692
27. Fischer M, Chapmann R, Tiny A: Alloimmunisation to HLA Antigen. *Vox Sang* 1985; 49: 331-335
28. Francis DMA: Relationship between blood transfusion and tumor behaviour. *Br J Surg* 1991; 78: 1420-1428
29. Friedmann BA, Burns TL, Schork MA: A study of blood utilisation by diagnosis, month of transfusion and geographic region of the United States. *Transfusion* 1979; 19: 511-525
30. Fujimoto J: Efficacy of autotransfusion in hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Arch Surg* 1993; 128: 1065-1069

31. Gärtner B, Mueller-Lantzsch N: Virologische Aspekte zur Sicherheit von Blut- und Plasmaprodukten. *Anaesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1999; 34: 486-488
32. Glück D, Kubanek B: Neuere Daten zur HIV-Epidemiologie in der BRD. *Beitr Infusionsther* 1993; 31: 1-4
33. Goodnough L, Brecher M, Kanther M, AuBuchon J: Transfusion medicin: First of two parts-blood transfusion. *N Engl J Med* 1999; 340: 438-447
34. Goodnough L, Monk T, Andriole G: Current concepts: Erythropoietin therapy. *N Engl J M* 1997; 336: 933-938
35. Hansen E, Frey I, Knüchel-Clarke R, Rüschoff J, Taeger K: Tumorzellen im Wundblut bei Tumorchirurgie und ihre teilweise Elimination durch Leukozytenfilter. *Hämatologie München Sympomed* 1994; 3: 116-122
36. Hansen E, Hofstädter F, Taeger K: Autologe Transfusion bei Tumoroperationen. *Infusionsther Transfusionsmed* 1994; 21: 337-347
37. Hansen E, Schlosser S, Altmeyen J: Die Bestrahlung von Wundblut aus Tumoroperationen zur Retransfusion. *Beitr Infusionsther* 1994; 32: 502-504
38. Hansen E, Wolff N, Knuechel R, Ruschoff J, Hofstaedter F, Taeger K: Tumor cells in blood shed from the surgical field. *Arch Surg* 1995; 130: 387-393
39. Hansen E: Intraoperative Autotransfusion in der Tumorchirurgie. *Habilitationsschrift* 1994
40. Harrison S, Steele R, Johnston A: Predesposit autologous blood transfusion in patients with colorectal cancer: a feasibility study. *Br J Surg* 1992; 79: 355-357
41. Hart J, Klimberg I: Intraoperativ autotransfusion in radical cystectomy for carcinoma of the bladder. *Surg Gynecol Obstet* 1989; 168: 302-306
42. Heal J, Chuang C, Blumberg N: Perioperative blood transfusions and prostate cancer recurrence and survival. *Am J Surg* 1988; 156: 374-380
43. Heiss M, Mempel W: Beneficial effect of autologous blood transfusion on infectious complication after colorectal cancer surgery. *Lancet* 1993; 342: 1328-1333
44. Heiss M, Mempel W: Klinische Auswirkungen der mit einer Bluttransfusion assoziierten Immunmodulation auf das Ergebnis der Tumoroperation. *Infusionsther Transfusionsmed* 1993; 20: 25-29

45. Hempelmann G, Scholz S, Michaelis G: Fremdblutsparende Verfahren in der operativen Medizin. In: Jahrbuch der Anästhesiologie und Intensivmedizin 1991/92 Biermann Verlag 1992; 45-59
46. Hertl H, Reiuland P, Lenz G, Decker K: Tumorzellkontamination bei maschineller Autotransfusion: Zellenachweis mittels radioaktiver Markierungstechnik. Nuklearmed 1991; 30: A63
47. Hiller J, Lubitz B, Dominka T, Kühnl P: Vergleich von Leukozytenfiltern für Erythrozytenkonzentrate. Beitr Infusionsther 1994; 32: 20-22
48. Homann B, Paravicini D: Autotransfusion - aktueller Standpunkt – Zukunftsaspekte. Anaesthesist 1984; 33: 598-605
49. Homann B, Zenne HP, Schauber J, Ackermann R: Tumor cells carried through autotransfusion. Are these cells still malignant? Acta Anaesthesiol Belg 1984; 35: 51-59
50. Hoyneck van Papendrecht M, Bush O: The influence of blood loss on tumor growth: effect and mechanism in experimental model. Neth J Surg 1991; 43: 85-88
51. Hoyneck van Papendrecht M, Hop W: Feasibility of a predesposit autologous blood donation program in colorectal cancer patients: results from a randomized clinical study. Vox Sang 1992; 62: 102-107
52. Hoyneck van Papendrecht M, Marquet R, Jeekel J: Immunologic consequences of blood transfusion: theoretical basis and clinical facts. Beitr Infusionsther 1993; 29: 17-25
53. Jaffray B: Predesposit autologous blood transfusion in patient with colorectal cancer: a feasibility study. Br J Surg 1992; 79: 977
54. Jahnsen S, Anderson M: Adverse effects of perioperative blood transfusion in patients with colorectal cancer. Eur J Surg 1992; 158: 419-425
55. Jensen L, Anderson A, Christiansen P, Hokland P: Postoperative infection and natural killer cell function following blood transfusion in patients undergoing elective colorectal surgery. Br J Surg 1992; 79: 513-516
56. Jensen L, Anderson A: Comparison of one dose versus three doses of prophylactic antibiotics. Br J Surg 1990; 77: 513-518
57. Karczewski D, Lema M: The efficiency of an autotransfusion system for tumor cell removal from blood salvaged during cancer surgery. Anesth Analg 1994; 78: 1131-1135

58. Kaspar M, Ramsy M, Nguyen A, Coswell m, Hurst g, Ramsay K: Continuous small-dose tranexamic acid reduces fibrinolysis but not transfusion requirements during orthotopic liver transplantation. *Anesth Analg* 1997; 85: 281-285
59. Kieseewetter H, Jung F: Qualitätssicherung bei der Eigenblutentnahme von kritisch Kranken. *Beitr Infusionsther* 1993; 31: 202-208
60. Klimberg I, Sirosis R: Intraoperative Autotransfusion in urologic oncology. *Arch Surg* 1986; 121: 1326-1329
61. Klimberg I: Autotransfusion and blood conservation in urologic oncology. *Sem Surg Oncol* 1989; 5: 286-292
62. Koscielny J, Radtke H, Petrow R, Pruß A, Stier C, Kalus U, Jung F, Moll A, Wenzel E, Kieseewetter H: Fremdblutsparende Maßnahmen und autologe Transfusionskonzepte. *Hämostaseologie* 1995; 15: 202-209
63. Koss L: Image Analysis and its Applications to Cytology. In: *Diagnostic Cytology and its Histopathologic Basis: 1572-1611 Igaku - Shoin New York Tokio 4th Edition*
64. Kress H, Eberlein T: Wirkung von Anästhesie und Operation auf wesentliche Immunfunktionen. *Anaesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1992; 27: 393-402
65. Kretschmer V, Dietrich G: Risiken der Transfusion. *Anaesthesist* 1990; 39: 107
66. Laupacis A, Fergusson D: Drugs to minimize perioperative blood loss in cardiac surgery: Meta-analyses using perioperative blood transfusion as the outcome. The International Study of Peri-operative Transfusion (ISPOT) Investigators. *Anesth Analg* 1997; 85: 1258-1267
67. Lentschener C, Benhamou D, Mercier F, Boyerneumann C, Naveau S, Smadje C, Wolf M, Franco D: Aprotinin reduces blood loss in patients undergoing elective liver resection. *Anesth and Analg* 1997; 84: 875-881
68. Lichtiger B, Huh Y: Autologous transfusion for cancer patients undergoing elective ablating surgery. *J Surg Oncol* 1990; 43: 19-23
69. Marquet R, Bruin R, Dallinga R: Modulation of tumor growth by allogenic blood transfusion. *J Cancer Res Clin Oncol* 1986; 111: 50-53
70. Marquet R, Hoyneck van Papendrecht M, Busch C, Jeekel J: Immunological consequences of blood donation. *Beitr Infusionsther* 1993; 31: 179-185
71. Marquet R, Hoyneck-van-Papendrecht M: Blood donation leads to a decrease in natural killer cell activity: a study in normal blood donor and cancer patients. *Transfusion* 1993; 33: 368-373

72. McClinton S, Moffat L: Blood transfusion and survival following surgery for prostatic carcinoma. *Br J Surg* 1990; 77: 140-142
73. Mehrkens HH: Klinischer Einsatz und Kontraindikation der maschinellen autologen Transfusion. *Beitr Infusionsther* 1992; 29: 146-157
74. Menges T, Wagner M, Welters I, Hempelmann G: Risiken und Nebenwirkungen der maschinellen Autotransfusion. In: *Eigenbluttransfusion heute* Mempel W, Schwarzfischer G, Mempel C *Hämatologie München Sympomed* 1995: 149-158
75. Mezrow C, Bergstein I, Tartter P: Postoperative infections following autologous and homologous blood transfusion. *Transfusion* 1992; 32: 27-30
76. Michaelis G, Füssle R, Schürholz A, Biscopig J: Hygienische Aspekte der maschinellen Autotransfusion bei längerfristigen Eingriffen. *Anaesthesist* 1992; 41: 199
77. Mikel U, Becker R: A comparative Study of Quantitative stains for DNA in Image Cytometry. *Anal Quant Cytol Histol* 1991; 13: 255-260
78. Miller G, Ramsden C, Primrose J: Autologous transfusion: an alternativ to transfusion with banked blood during surgery for cancer. *Br J Surg* 1991; 78: 713-715
79. Müller M, Kuhn D, Hinrichs B, Schindler E, Dreyer T, Hirsch C, Schäffer R, Hempelmann G: Ist die Elimination von Osteosarkomzellen durch die „Maschinelle Autotransfusion“ und Leukozyten-Depletionsfilter möglich? *Anaesthesist* 1996; 45: 834-838
80. Ness P, Walsh P: Prostate cancer recurrence in radical surgery patients recieving autologous or homologous blood. *Transfusion* 1992; 32: 31-36
81. Opelz G: Improvement of kidney graft - survival with increased numbers of blood donation. *N Engl J Med* 1978; 299: 799-803
82. Papanicolaou G: A new procedure for staining vaginal smears. *Science* 1942; 95: 438-439
83. Paravicini D: Essentielle Standards bei apparativer autologer Spende und Transfusion. *Beitr Infusionsther* 1991; 28: 341-347
84. Paravicini D: Intra- und postoperative Autotransfusion - eine Qualitätsanalyse. *Klin Wochenschr* 1988; 66: 29-32
85. Paravicini D: Maschinelle Autotransfusion (MAT). *Klin Anaesthesiol Intensivther* 1993; 43: 172-177

86. Peller S, Sayfan J: Immunological profile changes following perioperative autologous versus homologous blood transfusion in oncologic patients. *J Surg Oncol* 1994; 56: 98-101
87. Pfefferkorn T, Mempel W, Partecke G, Faul P: Reinigung von tumorzellkontaminiertem Operationsblut mit Spezialfiltersystemen. In: *Eigenbluttransfusion - eine aktuelle Übersicht. Hämatologie München Sympomed* 1993: 126-130
88. Pinto V, Baldoneo C, Barez A, Perez A: Relationship of transfusion and infectious complications after gastric carcinoma operations. *Transfusion* 1991; 31: 114-118
89. Pisters L, Wajzman Z: Use of predeposited autologous blood and intraoperativ autotransfusion in urologic cancer surgery. *Urology* 1992; 40: 211-215
90. Rebullà P, Poretti L: White cell-reduced red cells prepared by filtration: a critical evaluation of current filters and methods for counting residual white cells. *Transfusion* 1993; 33: 128-133
91. Salama A, Müller-Eckhardt C in: *Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten. Deutscher Ärzte Verlag Köln* 1995: pp21-27; pp163-207
92. Salo M: Immunosuppressive effects of blood transfusion in anaesthesia and surgery. *Acta Anaesthesiol Scand [Suppl]* 1988; 89: 26-34
93. Sato H, Khato J: Deformability and filtrability of tumor cells through nucleopore filter with reference to viability and metastatic spread. *Gann Monogr Cancer Res* 1977; 20: 3-10
94. Schiffer L, Atkins H: Extracorporeal irradiation of the blood in humans: Effects upon erythrocyte survival. *Blood* 1966; 27: 832-843
95. Schleinzner W, Mehrkens HH, Weindler M, Wollinsky K, Pohland H: Klinisches Konzept der autologen Transfusion: Hämodilution, maschinelle Autotransfusion, Plasmapherese, Eigenblutspende. *Anaesthesiol Intensivmed* 1987; 28: 235-241
96. Schriemer P, Longnecker D, Mintz P: The possible immunosuppressive effects of perioperative blood transfusion in cancer patients. *Anesthesiology* 1988; 68: 422-428
97. Singbartl G, Schleinzner W: Das Concept der Autologen Transfusion (CAT). *Beitr Infusionsther* 1991, 28: 283-286
98. Singh S, Marquet R: Consequences of blood loss on growth of artificial metastases. *Br J Surg* 1988; 75: 377-379

99. Slater N: Autologous blood transfusion today. *Br J Clin Pract* 1992; 46: 193-197
100. Spahn DR: Blood substitute: Artificial oxygen carriers: Perfluorocarbon emulsions. *Crit Care Med* 1999; 3: R93-97
101. Spahn DR, Casutt M: Elimination blood transfusions: new aspects and perspectives. *Anesthesiology* 2000; 93: 242-255
102. Stephen R, Kupper T, Geha A: Hemorrhage without tissue trauma produces immunosuppression and enhances susceptibility to sepsis. *Arch Surg* 1987; 122: 62-68
103. Tartter P: Transfusion-induced immunosuppression and perioperative infections. *Beitr Infusionsther* 1993; 31: 52-63
104. Vamvakas E, Moore S: Perioperative blood transfusion and colorectal cancer recurrence: a qualitative statistical overview and meta-analysis. *Transfusion* 1993; 33: 754-765
105. Velagapudi S, Frydenberg M: Homologous blood transfusion in patients with prostate cancer: no effect on tumor progression or survival. *Urology* 1994; 43: 821-827
106. Wiesel M, Gudemann C, Staehler G: Intraoperative maschinelle Autotransfusion in der Tumorchirurgie. *Hämatologie München Sympomed* 1993; 2: 131-137
107. Wiesel M, Gudemann C, Staehler G: Separation von urologischen Tumorzellen aus Cell-Saver-Blut durch Einsatz eines Membranfilters. *Urologe A* 1992; 31: 182-185
108. Wiesel M, Gudemann C, Staehler G: Tumorzellseparation durch Cell-Saver und Membranfilterpassage. *Infusionsther* 1991; 18: 143-144
109. Yaw P, Sentany M, Link W: Tumor cells carried through autotransfusion. *YAMA* 1975; 231: 490-491
110. Zimmermann T, Dobroschke J, Becker C, Kelm C, Padberg W: Der Einfluß der perioperativen Fremdblutgabe auf die Prognose des Bronchialkarzinoms. *Langenbecks Arch Surg* 1993; 378: 145-149
111. Zulim R, Rocco M: Intraoperative Autotransfusion in hepatic resection for malignancy is it save? *Arch Surg* 1993; 128: 206-211

8 Abbildungen und Tabellen:

Bild 1: Osteosarkomzellen gefärbt nach Hämatoxylin-Eosin und nach Pappenheim

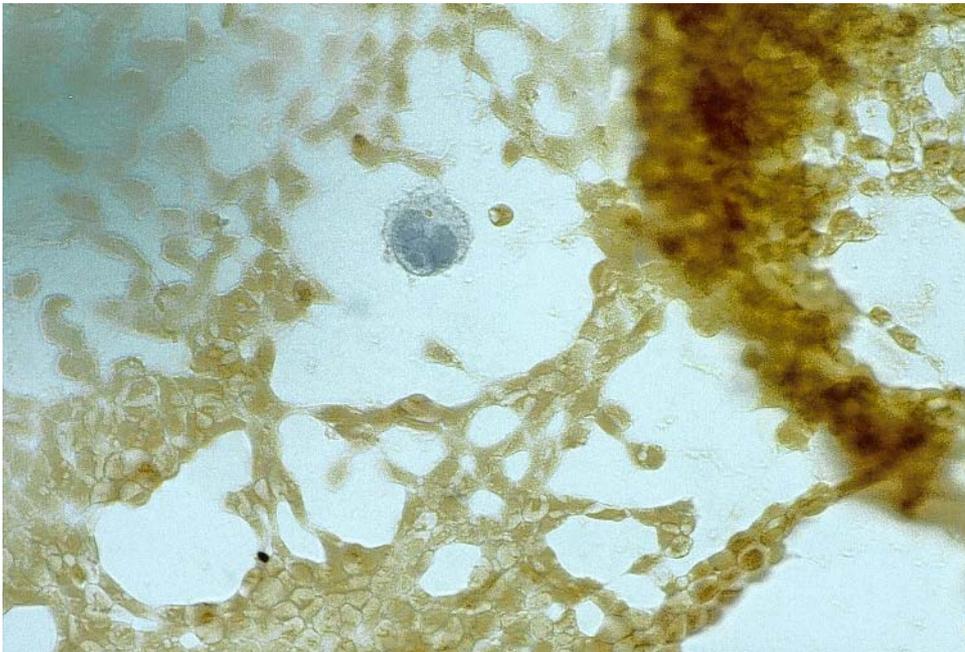


Bild 2: Osteosarkomzellen immunzytochemische Vimentinexpression



Bild 3: Osteosarkomzellen gefärbt nach Feulgen

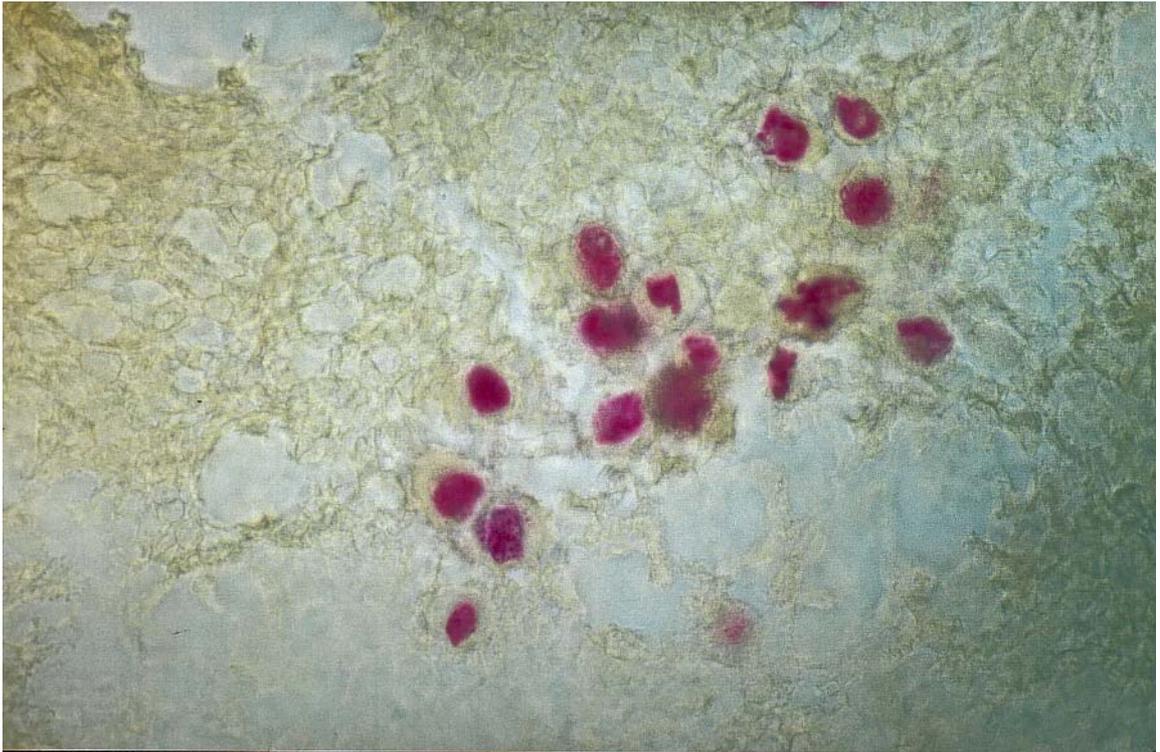


Abbildung 2: benigne Zellsuspension (durchgezogene Linie) und drei maligne Zellsuspensionen (gestrichelte Linien) nach Koss et al.[63]

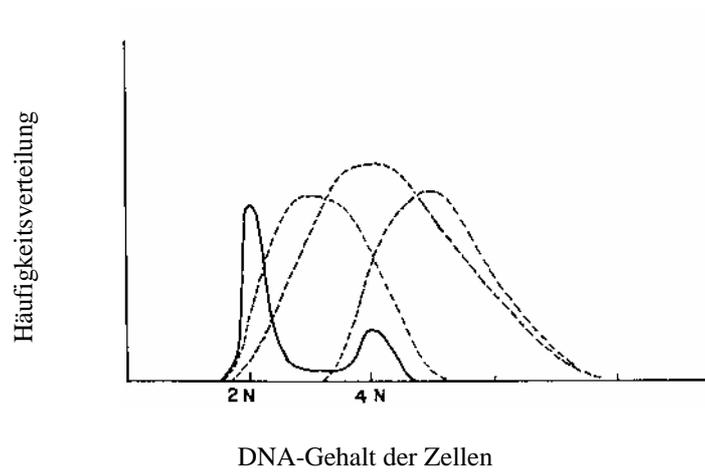


Abbildung 3: Diagramm einer DNA-Analyse einer Fibroblastenzellsuspension

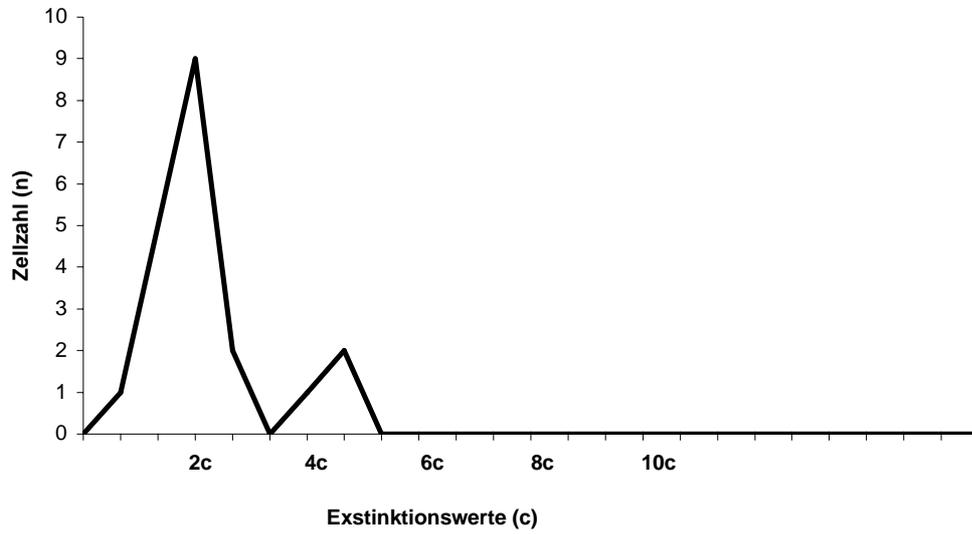


Abbildung 4: Diagramm einer DNA-Analyse einer Zellsuspension mit Osteosarkomzellen

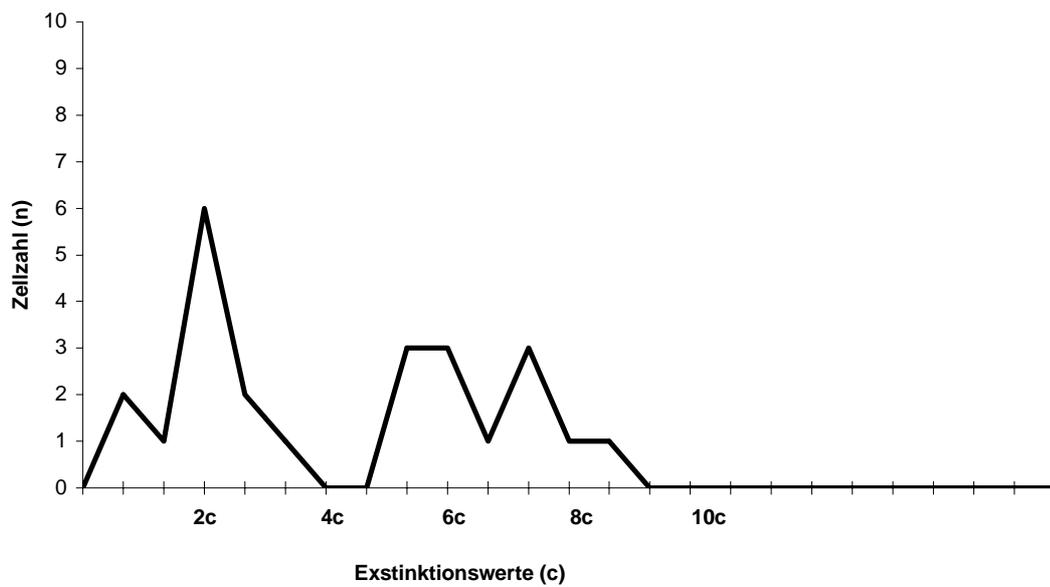


Tabelle 4: Papanicolaou-Klassifikation (PAP) und Immunzytochemie:

PAP-Klassifikation:

Normale Zellen (PAP 1), regelwidrige Zellen ohne Tumorverdacht (PAP 2), verdächtige Zellen (PAP 3), stark verdächtige Zellen (PAP 4), maligne Zellen (PAP 5).

Immunzytochemie (Vimentinexpression):

Stark positiv (+++), positiv (++), schwach positiv (+), negativ (-).

Nr.:	Messzeitpunkt:	Tumorzell-konzentration:	PAP-Klassifikation:	Vimentin-expression:
1a	Ansatz (a)	10000/ml	5	++
1b	Vor Leuk.-Filter (b)		5	+
1c	Nach Leuk.-Filter (c)		1	-
2a	Ansatz (a)	10000/ml	5	++
2b	vor Leuk.-Filter (b)		5	+
2c	nach Leuk.-Filter (c)		1	-
3a	Ansatz (a)	10000/ml	5	+
3b	vor Leuk.-Filter (b)		1	+
3c	nach Leuk.-Filter (c)		1	-
4a	Ansatz (a)	10000/ml	5	+
4b	vor Leuk.-Filter (b)		5	+
4c	nach Leuk.-Filter (c)		1	-
5a	Ansatz (a)	10000/ml	5	++
5b	vor Leuk.-Filter (b)		5	+
5c	nach Leuk.-Filter (c)		1	-
6a	Ansatz (a)	7111/ml	5	++
6b	vor Leuk.-Filter (b)		5	+
6c	nach Leuk.-Filter (c)		1	-
7a	Ansatz (a)	1667/ml	5	+
7b	vor Leuk.-Filter (b)		5	++
7c	nach Leuk.-Filter (c)		1	-
8a	Ansatz (a)	167/ml	1	+
8b	vor Leuk.-Filter (b)		1	-
8c	nach Leuk.-Filter (c)		1	-

Tabelle 5: DNA-Analyse der Zytospinpräparate:

Absolutwert DNA beinhaltender Zellen (Anzahl kernhaltiger Zellen),
Absolutwert eindeutig hypertetraploider Zellen (Anzahl hypertetraploider Zellen)

Nr.:	Messzeitpunkt:	Tumorzell- konzentration:	Anzahl kernhaltiger Zellen (k)	Anzahl hypertetraploider Zellen (h)
1a	Ansatz (a)	10000/ml	27	4
1b	vor Leuk.-Filter (b)		35	4
1c	nach Leuk.-Filter (c)		0	0
2a	Ansatz (a)	10000/ml	27	1
2b	vor Leuk.-Filter (b)		12	0
2c	nach Leuk.-Filter (c)		0	0
3a	Ansatz (a)	10000/ml	15	4
3b	vor Leuk.-Filter (b)		6	1
3c	nach Leuk.-Filter (c)		0	0
4a	Ansatz (a)	10000/ml	24	1
4b	vor Leuk.-Filter (b)		9	3
4c	nach Leuk.-Filter (c)		0	0
5a	Ansatz (a)	10000/ml	9	1
5b	vor Leuk.-Filter (b)		8	0
5c	nach Leuk.-Filter (c)		0	0
6a	Ansatz (a)	7222/ml	11	3
6b	vor Leuk.-Filter (b)		5	1
6c	nach Leuk.-Filter (c)		0	0
7a	Ansatz (a)	1667/ml	21	7
7b	vor Leuk.-Filter (b)		7	3
7c	nach Leuk.-Filter (c)		0	0
8a	Ansatz (a)	167/ml	8	3
8b	vor Leuk.-Filter (b)		7	2
8c	nach Leuk.-Filter (c)		0	0

**Abbildung 5: Prozentualer Nachweis hypertetraploider Zellen mit der DNA-Analyse
($p < 0,01$; gepaarter T-Test)**

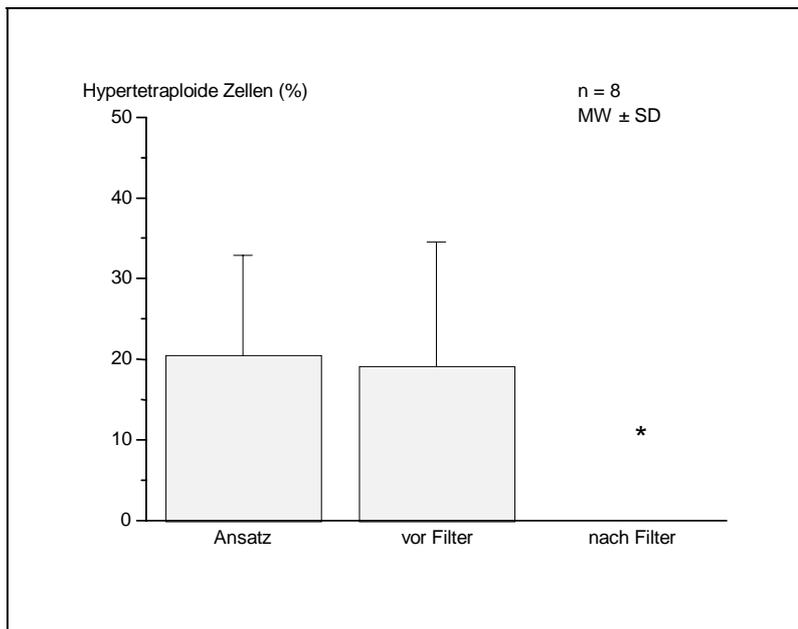


Abbildung 6: Schema der maschinellen Autotransfusion [39].

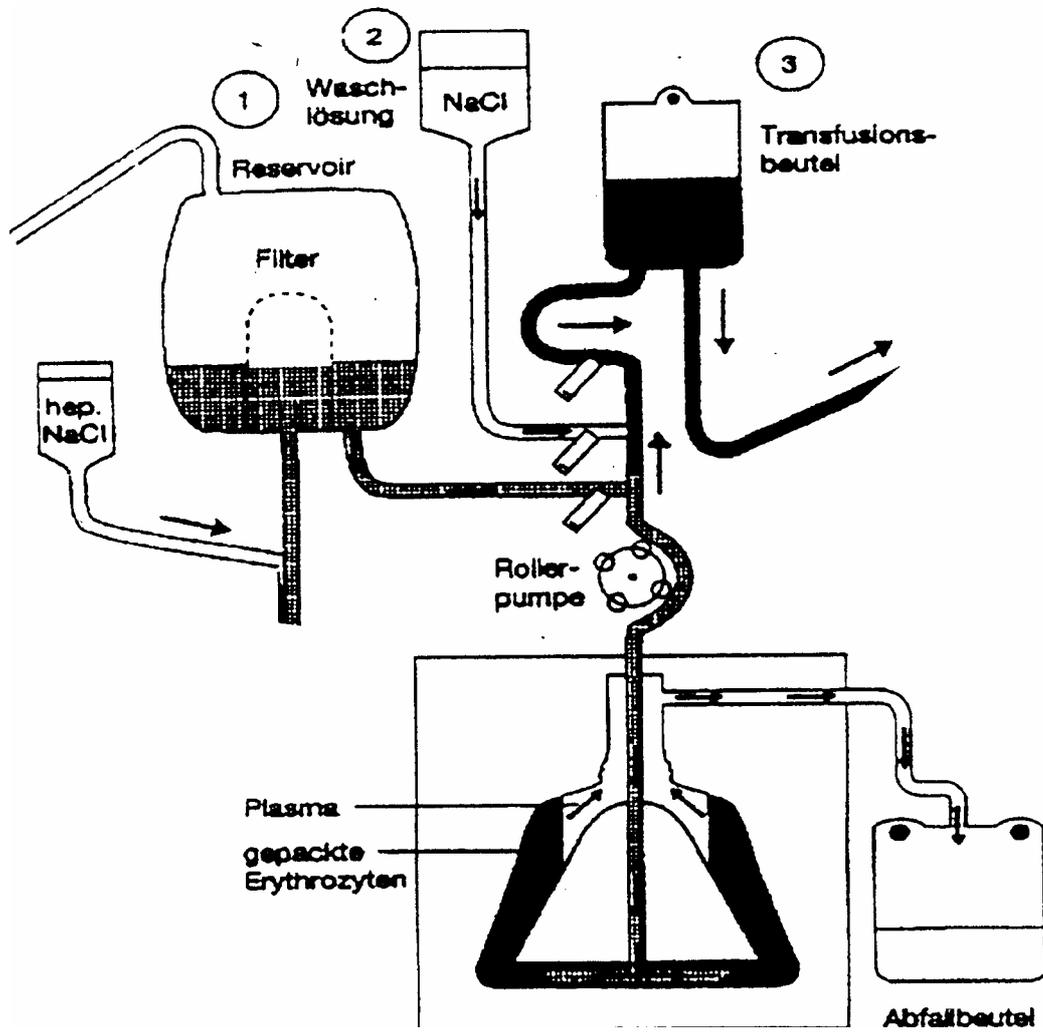


Tabelle 6: Material:

- Humane Osteosarkomzelllinie (MG 63) aus Zellbank ATCC CRL 1427 (American Tissue Culture Collection), Rockville, MB, USA
- Zellzählungsgerät Coulter Counter S PLUS STKR
(Fa. Coulter, Krefeld, Deutschland)
- Erythrozytenkonzentrat (300 ml)
(DRK Blutspendedienst, Frankfurt a. M., Deutschland)
- NaCl 0,9% 100 ml
(Fa. B. Braun, Melsungen, Deutschland)
- NaCl 0,9% 500 ml
(Fa. B. Braun, Melsungen, Deutschland)
- Autotransfusionsgerät DIDECO Autotransfusion BT 795 / P
(Fa. DIDECO, Mirandola, Italien)
- Autotransfusionssystem dideco codice 710
(Fa. DIDECO, Mirandola, Italien)
- Leukozyten-Depletionsfilter Pall BPF 4B
(Fa. Pall Biomedizin GmbH, Dreieich, Deutschland)
- Zytocentrifuge "Cytospin 2"
(Fa. Shandon, Frankfurt a. M., Deutschland)
- Färbung nach Papanicolaou [82]
- Färbung mit Hämatoxylin-Eosin [17]
- Immunocytochemie:
 - monoklonale Antikörper gegen Intermediärfilament Vimentin (V9)
 - Brückenantikörper (Z 259 rabbit-anti-mouse)
 - APAAP Komplex (D 651 mouse monoclonal)
(Fa. DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Feulgenfärbung [17]
- Bildanalysegerät IBAS
(Fa. Kontron, München, Deutschland)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. G. Hempelmann danke ich für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit in seiner Abteilung die vorliegende Studie durchzuführen; ihm und seinen beteiligten Mitarbeitern sei hiermit herzlich gedankt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. M. Müller für seine freundliche Unterstützung, für die ständige Diskussionsbereitschaft und seine kritischen Anmerkungen.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Pathologischen Institutes. Herrn Dr. B. Hinrichs danke ich für die geduldige Betreuung, für die Auswertung der zytologischen Präparate und die technische Unterstützung bei der Arbeit mit den histologischen Präparaten.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Hirsch
Vorname:	Christoph
Geburtsdatum/-ort:	24. 12. 1968, Ravensburg
Familienstand:	verheiratet, drei Kinder

Schulbildung:

1975 – 1979	Grundschule Bad Waldsee
1979 – 1988	Gymnasium Bad Waldsee
18. Mai 1988	Abitur
Nov. 1988 - März 1989	Ausbildung zum Rettungsassistent

Hochschulbildung:

Sommersemester 1989	Immatrikulation zum Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
April 1991	Ärztliche Vorprüfung
April 1992	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 1994	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
ab Mai 1994	Praktisches Jahr: Justus-Liebig-Universität Gießen (Wahlfach Anaesthesiologie)
27. April 1995	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang:

1.12.95 – 31.5.97	Arzt im Praktikum in der Klinik für Anaesthesie und Operative Intensivmedizin St. Vincentius-Kliniken Karlsruhe
01.06.1997	Approbation
seit 01.06.1997	Assistenzarzt in der Klinik für Anaesthesie und Operative Intensivmedizin St. Vincentius-Kliniken Karlsruhe
19.02.2002	Facharzt für Anaesthesiologie

